



Universidade Nova de Lisboa

**Reavaliação dos nichos ecológicos de
Streptococcus pneumoniae em adultos com
mais de 60 anos por PCR em tempo real**

Tânia Raquel de Sousa Pedro

**Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Médica**

(Outubro, 2015)



Universidade Nova de Lisboa

**Reavaliação dos nichos ecológicos de
Streptococcus pneumoniae em adultos com
mais de 60 anos por PCR em tempo real**

Autora: Tânia Raquel de Sousa Pedro

Orientadora: Doutora Raquel Sá-Leão

Co-orientadora: Mestre Sónia Almeida

Unidade: Laboratório de Microbiologia Molecular de Patógenos Humanos (LMMPH)

Instituição: Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa
(ITQB/UNL)

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica

(Outubro, 2015)

Agradecimentos

A conclusão desta tese de mestrado revela-se não só o cumprimento de um intenso desafio pessoal e profissional, como também o culminar de uma longa jornada académica cujas palavras de ordem foram o rigor, empenho e dedicação. Tal feito só foi possível alcançar graças ao apoio e acompanhamento de várias pessoas, às quais expresso os meus reconhecidos agradecimentos:

À minha orientadora, Doutora Raquel Sá-Leão, por me ter possibilitado a realização do estágio e tese de mestrado sob a sua orientação; pelo excelente trabalho enquanto orientadora, pela sua amizade, confiança, crítica e motivação necessárias ao desenvolvimento deste trabalho e revisão meticulosa do mesmo. Por toda a sua sabedoria e dedicação inigualável à ciência, por ter fomentado em mim o espírito crítico e de investigação durante o ano que estive sob a sua orientação;

À minha co-orientadora, Mestre Sónia Almeida, por todas as horas de dedicação ao meu trabalho, em especial na reta final do mesmo; pelo “*know-how*” e paciência/disponibilidade para me transmiti-lo; por todo o apoio, não só técnico, mas acima de tudo moral, em especial nos momentos mais difíceis.

A todas as minhas colegas investigadoras do Laboratório de Microbiologia Molecular de Patógenos Humanos (LMMPH), do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa (ITQB/UNL), por todo o apoio técnico que foi sendo imprescindível à realização desta tese.

Aos meus PAIS, ao meu irmão Rui e cunhada Elsa, por todo o amor, carinho, apoio e compreensão. Por serem os guerreiros, cada um à sua maneira, por me inspirarem a nunca desistir. Esta é também uma vitória vossa. Obrigado!

Às princesas da minha vida, Leonor e Sara, pelo amor indescritível a três, pelas brincadeiras, pelos passeios e pelas melhores gargalhadas do mundo que me fazem encarar a vida com um sorriso. Porque o futuro é vosso, para que vejam na tia mais um exemplo a seguir.

Ao Bruno, que vivenciaste tudo isto ao mais ínfimo pormenor, pelo teu amor, companheirismo e suporte incondicional, por nunca me deixares desistir, e acima de tudo, por nunca teres desistido de mim. Pela tua compreensão inigualável, pelas longas horas de desabafo, por seres o tal. Não há palavras que cheguem para tamanha gratidão.

À Sílvia, Inês Melo, Filipa e Inês Jesus, amigas de licenciatura, por sempre acreditarem que eu seria capaz. Por mesmo estando distantes (demais), me darem aquele apoio, aquela palavra certa, na hora exata.

À Andreia e Sara, por serem as de sempre e para sempre, por estarem sempre cá, mesmo quando as circunstâncias não nos permitem ser tão presentes quanto gostaríamos.

A todos os meus amigos e colegas, com especial destaque para a Vera, Fátima e Jorge, pelas viagens que já deixam saudades, pelos jantares, pelas saídas e por todas as horas de convívio e estudo juntos.

A todos, família e amigos, os meus mais sinceros agradecimentos.

Por possibilitarem a realização de um sonho...

*Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow.
The important thing is not to stop questioning.*

Albert Einstein

Resumo

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria que faz parte da flora comensal do trato respiratório superior. Os estudos de colonização por *S. pneumoniae* em idosos são escassos mas estão a ganhar uma importância crescente, dado o aumento da esperança média de vida da população em geral e o facto da incidência da doença pneumocócica ser particularmente elevada neste grupo etário.

O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de colonização da nasofaringe e orofaringe por *S. pneumoniae*, em adultos com mais de 60 anos, por amplificação em tempo real de dois genes específicos, *lytA* e *piaA*. Investigaram-se duas coleções de amostras anteriormente caracterizadas utilizando apenas o método convencional de cultura: uma correspondente às amostras de 78 indivíduos residentes num lar de idosos, e outra correspondente às amostras de 200 indivíduos selecionadas aleatoriamente de um estudo realizado na comunidade. Foi ainda determinado o serótipo presente nas amostras positivas para *S. pneumoniae* recorrendo a PCR convencional e sequenciação de fragmentos de genes capsulares.

Observou-se uma taxa de colonização mais elevada na orofaringe do que na nasofaringe, havendo vantagem em investigar a prevalência de colonização nas duas localizações anatómicas. A prevalência de colonização por *S. pneumoniae* aumentou significativamente na coleção da amostra aleatória com uso da PCR em tempo real (9,0% vs 3,5%; $p=0,02$). No lar de idosos a prevalência de colonização foi mais elevada, não sendo, no entanto, estatisticamente significativa a diferença relativamente ao estudo anterior (20,5% vs 16,7%; $p = 0,54$). A diversidade de serótipos foi elevada em ambas as coleções e globalmente comparável com os resultados obtidos anteriormente por métodos tradicionais de cultura.

Em conclusão, no estudo de portadores de *S. pneumoniae* em adultos, onde a densidade de colonização é frequentemente baixa, a utilização de métodos de deteção com uma sensibilidade muito superior à da cultura é particularmente relevante.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*, colonização, população sénior, PCR em tempo real, serótipo.

Abstract

Streptococcus pneumoniae is a commensal bacterium that inhabits the upper respiratory tract. *S. pneumoniae* colonization studies in the elderly are scarce but are becoming increasingly important, since the population life expectancy in general is increasing and the incidence of pneumococcal disease is particularly high in this age group.

The aim of this study was to evaluate the prevalence of nasopharyngeal and oropharyngeal colonization by *S. pneumoniae*, in adults aged over 60 years old, by real-time amplification of two specific genes, *lytA* and *piaA*. Two collections of samples previously characterized by conventional culture were investigated: one corresponding to samples of 78 individuals living in a retirement home and other corresponding to samples of 200 individuals randomly selected from a study conducted in the community. *S. pneumoniae* serotypes present in positive samples were determined by PCR and, if needed, by sequencing of fragments of capsular genes.

A higher colonization rate in the oropharynx than in the nasopharynx was observed. Still, the combined screening of the two anatomical sites gave the best sensitivity. Use of real-time PCR resulted in a significant increase in the detection of *S. pneumoniae* colonization in the random sample collection (9.0% vs 3.5%; $p=0.02$). In the retirement home collection, the colonization prevalence was also higher when real-time PCR was used, however the difference was not statistically significant when compared to culture-based methods (20.5% vs 16.7%; $p = 0.54$). Serotype diversity was high in both collections and globally comparable with the results previously obtained by traditional culture methods.

In conclusion, the study of *S. pneumoniae* carriage in adults, where colonization density is often low, benefits significantly from the use of highly sensitivity methods such as real-time PCR.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, colonization, senior population, real-time PCR, serotype.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice de figuras.....	ix
Índice de gráficos	x
Índice de tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos	xiii
1. Introdução	1
1.1. A bactéria <i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
1.1.1. Características gerais de <i>S. pneumoniae</i>	2
1.1.2. Fatores de virulência de <i>S. pneumoniae</i>	4
1.1.3. Epidemiologia da colonização por <i>S. pneumoniae</i>	5
1.1.4. Epidemiologia da doença invasiva pneumocócica (DIP).....	7
1.1.5. Vacinas pneumocócicas.....	9
1.2. Metodologias de deteção e identificação de <i>S. pneumoniae</i> utilizadas no âmbito desta tese	12
1.2.1. Deteção de <i>S. pneumoniae</i> pelo método convencional baseado na cultura em meio sólido	12
1.2.2. Deteção dos genes de <i>S. pneumoniae</i> <i>lytA</i> e <i>piaA</i> pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	13
1.2.3. Determinação do tipo de cápsula por PCR convencional	15
1.3. Objetivos	16
2. Materiais e Métodos.....	18
2.1. População e amostra.....	19
2.2. Declaração de ética	19
2.3. Trabalho de campo	20

2.3.1. Colheita das amostras biológicas.....	20
2.3.2. Processamento das amostras biológicas	21
2.3.3. Protocolos	23
a) Extração de DNA.....	23
b) Detecção de <i>S. pneumoniae</i> por PCR em tempo real (<i>lytA</i> & <i>piaA</i>)	23
c) Determinação do tipo de cápsula por PCR convencional (estratégia CDC) ...	25
d) PCR convencional para detecção de estirpes NTPn.....	26
e) Sequenciação de um fragmento do gene da cápsula.....	27
2.4. Análise estatística.....	28
3. Resultados.....	29
3.1. Caracterização das coleções	30
3.1.1. <u>Coleção</u> : Lar de idosos	30
3.1.2. <u>Coleção</u> : Amostra aleatória	30
3.2. Análise descritiva dos dados obtidos	30
3.2.1. Detecção de <i>S. pneumoniae</i> pelo método convencional de cultura em meio sólido (no âmbito do projeto <i>PneumoEL</i>) versus detecção de <i>S. pneumoniae</i> por PCR em tempo real (<i>lytA</i> & <i>piaA</i>).....	30
a) <u>Coleção</u> : Lar de idosos	31
b) <u>Coleção</u> : Amostra aleatória	32
3.2.2. Tipo de cápsula de <i>S. pneumoniae</i>	34
a) <u>Coleção</u> : Lar de idosos	34
b) <u>Coleção</u> : Amostra aleatória	38
3.2.3. Prevalência de portadores de <i>S. pneumoniae</i>	43
4. Discussão e conclusões	46
5. Referências bibliográficas	54
ANEXOS.....	62

Índice de figuras

Figura 1-1: <i>S. pneumoniae</i> – coloração de Gram de uma preparação da secreção do ouvido médio.....	3
Figura 1-2: Cultura de <i>S. pneumoniae</i> em agar de sangue.....	3
Figura 1-3: Via de disseminação e modos de infecção por <i>S. pneumoniae</i>	7
Figura 1-4: Representação ilustrativa da frequência / severidade da doença causada por <i>S. pneumoniae</i>	8
Figura 1-5: Princípio de ação do método de PCR em tempo real.....	13
Figura 1-6: Gráfico de amplificação exemplificativo, gerado pelo equipamento de PCR em tempo real (número de ciclos de amplificação vs. unidades de fluorescência).....	14
Figura 1-7: Exemplo de um gel de eletroforese.....	16
Figura 2-1: (A) Colheita de exsudado da nasofaringe; (B) Colheita de exsudado orofaríngeo.....	20
Figura 2-2: Metodologia aplicada ao processamento das amostras biológicas.....	21
Figura 2-3: Programa de PCR utilizado para a detecção de <i>S. pneumoniae</i> (genes <i>lytA</i> & <i>piaA</i>).....	24
Figura 3-1: (A) Análise dos resultados da sequenciação – estirpe com 100% de homologia com a estirpe de referência; (B) Análise dos resultados da sequenciação-estirpe com 92% de homologia com a estirpe de referência, não correspondendo ao serótipo em causa.....	35

Índice de gráficos

Gráfico 1-1: Prevalência de colonização por <i>S. pneumoniae</i> de acordo com a faixa etária, entre residentes de comunidades rurais no Alasca, entre 2000 e 2001.....	6
Gráfico 1-2: Incidência de doença invasiva pneumocócica relativamente à idade, em Inglaterra e País de Gales, entre 1996 e 2005.....	9
Gráfico 3-1: Detecção por PCR em tempo real (<i>lytA</i> e <i>piaA</i>) de <i>S. pneumoniae</i> no crescimento bacteriano total de exsudado nasofaríngeo (N) e orofaríngeo (O), dos indivíduos residentes no <u>lar de idosos</u>	32
Gráfico 3-2: Detecção por PCR em tempo real (<i>lytA</i> e <i>piaA</i>) de <i>S. pneumoniae</i> no crescimento bacteriano total de exsudado nasofaríngeo (N) e orofaríngeo (O), dos indivíduos pertencentes à <u>amostra aleatória</u>	33
Gráfico 3-3: Diversidade de serótipos de <i>S. pneumoniae</i> detetados por PCR convencional (estratégia do CDC), das amostras referentes aos indivíduos residentes no <u>lar de idosos</u>	38
Gráfico 3-4: Diversidade de serótipos de <i>S. pneumoniae</i> detetados por PCR convencional (estratégia do CDC), das amostras referentes aos indivíduos pertencentes à <u>amostra aleatória</u>	43
Gráfico 3-5: <i>Ranking</i> de serótipos detetados por PCR convencional (estratégia do CDC) do total de portadores de <i>S. pneumoniae</i> referentes aos indivíduos residentes no <u>lar de idosos</u>	44
Gráfico 3-6: <i>Ranking</i> de serótipos detetados por PCR convencional (estratégia do CDC) do total de portadores de <i>S. pneumoniae</i> referentes aos indivíduos pertencentes à <u>amostra aleatória</u>	44

Índice de tabelas

Tabela 2-1: Volumes de reagente a utilizar na reação de PCR em tempo real para a detecção de <i>S. pneumoniae</i> (genes <i>lytA</i> & <i>piaA</i>).....	24
Tabela 2-2: Volumes de reagente a utilizar na reação de PCR convencional para detecção de estirpes NTPn.....	26
Tabela 2-3: Volumes de reagente a utilizar na reação de PCR para posterior sequenciação do fragmento do gene da cápsula.....	27
Tabela 3-1: Resultados da determinação do tipo de cápsula, das amostras positivas para a presença de <i>S. pneumoniae</i> , correspondentes aos indivíduos residentes no <u>lar de idosos</u>	36
Tabela 3-2: Amostras correspondentes aos indivíduos residentes no <u>lar de idosos</u> que foram submetidas a sequenciação do fragmento do gene da cápsula.....	37
Tabela 3-3: Resultados da determinação do tipo de cápsula, das amostras positivas para a presença de <i>S. pneumoniae</i> , correspondentes aos indivíduos pertencentes à <u>amostra aleatória</u>	40
Tabela 3-4: Amostras correspondentes aos indivíduos pertencentes à <u>amostra aleatória</u> que foram submetidas a sequenciação do fragmento do gene da cápsula.....	41
Tabela 3-5: Detecção de portadores de <i>S. pneumoniae</i> de acordo com a localização anatômica e método de detecção utilizado.....	45
Tabela IV-1: Sequências de <i>primers</i> e sondas utilizadas na reação de PCR em tempo real para a detecção de <i>S. pneumoniae</i> (genes <i>lytA</i> & <i>piaA</i>).....	66
Tabela V-1: <i>Primers</i> de PCR – gene <i>cpsA</i>	67
Tabela V-2: <i>Master mix</i> – gene <i>cpsA</i>	67
Tabela VI-1: <i>Primers</i> de PCR – GR1	68
Tabela VI-2: <i>Master mix</i> - GR 1	68
Tabela VI-3: <i>Primers</i> de PCR - GR 2	69
Tabela VI-4: <i>Master mix</i> - GR 2	69
Tabela VI-5: <i>Primers</i> de PCR - GR 3	70
Tabela VI-6: <i>Master mix</i> – GR 3	70

Tabela VI-7: <i>Primers</i> de PCR - GR 4.....	71
Tabela VI-8: <i>Master mix</i> – GR 4.....	71
Tabela VI-9: <i>Primers</i> de PCR - GR 5.....	72
Tabela VI-10: <i>Master mix</i> – GR 5.....	72
Tabela VI-11: <i>Primers</i> de PCR – GR6.....	73
Tabela VI-12: <i>Master mix</i> – GR6.....	73
Tabela VI-13: <i>Primers</i> de PCR – SG23.....	74
Tabela VI-14: <i>Master mix</i> – SG23.....	74
Tabela VI-15: <i>Primers</i> de PCR – 15B/C (uniplex).....	75
Tabela VI-16: <i>Master mix</i> – 15B/C (uniplex).....	75
Tabela VII-1: Sequência dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR convencional para detecção de NTPn.....	76
Tabela VIII-1: Preparação das soluções de trabalho necessárias ao protocolo de purificação pelo método Exo-SAP.....	77
Tabela IX-1: Detecção de <i>S. pneumoniae</i> no crescimento bacteriano total de exsudado nasofaríngeo e orofaríngeo, das amostras pertencentes aos indivíduos residentes no <u>lar de idosos</u>	78
Tabela IX-2: Detecção de <i>S. pneumoniae</i> no crescimento bacteriano total de exsudado nasofaríngeo e orofaríngeo, das amostras pertencentes aos indivíduos da <u>amostra aleatória</u>	79

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

BD: *Becton Dickinson*

BHQ: *Black Hole Quencher*

CBT: Crescimento Bacteriano Total

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

C_t: *Threshold cycle*

Cy5: Indodicarbocianina

DIP: Doença Invasiva Pneumocócica

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleótidos fosfatados

DOC: Desoxicolato de sódio

EtBr: Brometo de etídio

FAM: 6-Carboxifluoresceína

FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

GBA: *Gentamicin Blood Agar*

GR: Grupo Reacional

HEX: Hexacloro-6-Carboxifluoresceína

MH: *Mueller-Hinton*

MLST: *MultiLocus Sequence Typing*

NTPn: Pneumococos não tipáveis

pb: Pares de bases

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PCV: Vacina Conjugada Pneumocócica

PNV: Plano Nacional de Vacinação

PPV: Vacina Polissacárida Pneumocócica

PsaA: Adesina de Superfície Pneumocócica A

PspA: Proteína de Superfície Pneumocócica A

ROX: 6-Carboxi-X-Rodamina

SAP: *Shrimp Alkaline Phosphatase*

SMG: *Streptococcus of the mitis group*

STGG: *Skim milk Tryptone-Glucose-Glycerol*

TE: Tris-EDTA

TSA: *Trypticase Soy Agar*

TSB: *Tryptone Soya Broth*

VIH: Vírus da Imunodeficiência Humana

1. Introdução

1. Introdução

1.1. A bactéria *Streptococcus pneumoniae*

Foi no final do século XIX, no ano de 1881, que a bactéria *Streptococcus pneumoniae* foi isolada pela primeira vez, independentemente, por dois cientistas: Louis Pasteur em França, e George M. Sternberg nos Estados Unidos da América. Ambos injetaram saliva humana em coelhos; Pasteur utilizou saliva de uma criança com raiva, ao passo que Sternberg utilizou a sua própria saliva, tendo ambos recuperado pneumococos do sangue desses mesmos coelhos. Cada investigador descreveu assim o mesmo organismo, mas com nomenclaturas diferentes: foi nomeado *Microbe septicemique du salive* por Pasteur e *Micrococcus pasteurii* por Sternberg [1]. Em 1886, Fraenkel designou-o de *Pneumococcus*, devido à sua propensão para causar pneumonia [1]. Mais tarde, em 1920, a bactéria foi denominada *Diplococcus pneumoniae*, uma vez que formava dois cocos em exame direto por coloração de Gram de uma expetoração [2]. Por último, em 1974, esta designação foi modificada para a atual “*Streptococcus pneumoniae*”, devido ao seu crescimento em cadeia quando cultivada em meio líquido [3].

1.1.1. Características gerais de *S. pneumoniae*

Em termos taxonómicos, *S. pneumoniae* pertence à família *Streptococcaceae* [4]. As bactérias do género *Streptococcus* são bactérias que coram positivamente pela técnica de Gram (figura 1-1). A sua parede celular é constituída maioritariamente por várias camadas de peptidoglicano, matriz na qual está inserida uma grande variedade de proteínas, polissacáridos e ácidos teicóicos [4]. A parede celular ao estimular o recrutamento de células inflamatórias para o local da infeção, a produção de citocinas e a ativação da cascata do complemento, é a principal componente responsável pela reação inflamatória que acompanha o processo de infeção pneumocócica (revisto em [5]).

No que diz respeito à aparência microscópica, as bactérias do género *Streptococcus* tendem a crescer aos pares (caso específico de *S. pneumoniae* que forma diplococos) ou em longas cadeias [4].

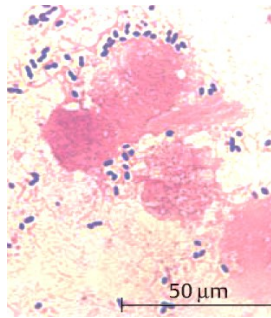


Figura 1-1: *S. pneumoniae* – coloração de Gram de uma preparação da secreção do ouvido médio.
Adaptado de [6]

Em laboratório, *S. pneumoniae* é uma bactéria nutricionalmente exigente, necessitando de meios de crescimento complexos, frequentemente suplementados com sangue ou soro. A exigência de meios suplementados com sangue deve-se ao facto de *S. pneumoniae* não produzir catalase, necessitando de uma fonte que lhe forneça esta enzima de modo a neutralizar o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) produzido pela própria bactéria como forma de competição com outras bactérias comensais [7].

Nestes meios, as colónias de *S. pneumoniae* desenvolvem α -hemólise, ou seja, formam um halo verde ao redor da colónia. Este halo é causado pela libertação de H_2O_2 , que converte a hemoglobina em metahemoglobina, conferindo ao meio de cultura a cor verde [6] (figura 1-2). Quanto ao aspeto morfológico, as colónias são redondas, com cerca de 1 mm de diâmetro, ligeiramente transparentes, e podem ser mais ou menos mucóides, dependendo se estamos perante uma estirpe que é maior ou menor produtora do polissacárido capsular [7].

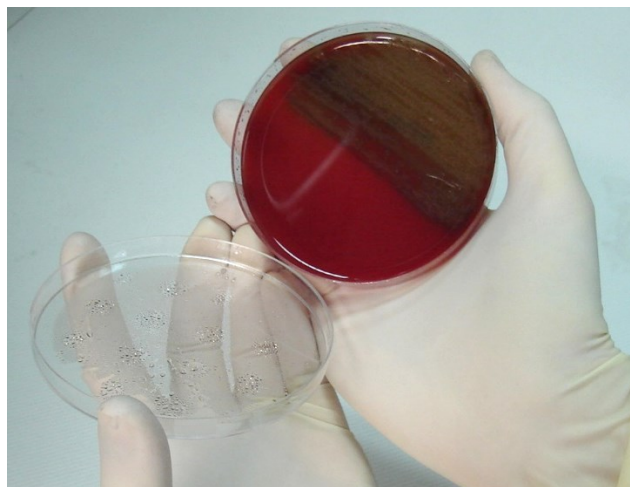


Figura 1-2: Cultura de *S. pneumoniae* em agar de sangue.
Laboratório de Microbiologia Molecular de Patógenos Humanos (LMMPH)

As bactérias do género *S. pneumoniae* são anaeróbias facultativas e crescem melhor numa atmosfera enriquecida em CO₂ (geralmente 5%) [4].

Na maioria dos casos é possível a sua distinção de outros estreptococos α -hemolíticos, tais como os *Streptococcus mitis*, através dos testes de optoquina (cloridrato de etil-hidrocupreína) e da solubilidade em desoxicolato de sódio (DOC). Contrariamente aos *S. mitis*, os pneumococos são sensíveis à optoquina (zona de inibição com halo de diâmetro igual ou superior a 14 mm) e solúveis em DOC [4].

1.1.2. Fatores de virulência de *S. pneumoniae*

S. pneumoniae possui diversos fatores de virulência, tais como a pneumolisina, a autolisina, a proteína de superfície pneumocócica A (PspA) e a IgA₁ protease, entre outras. No entanto, o principal fator de virulência é a cápsula polissacárida. Esta confere-lhe vantagem não só ao nível da capacidade de colonização como também na resistência à fagocitose por parte do hospedeiro [4,8].

A maioria das estirpes de pneumococos está envolvida por uma cápsula espessa, estruturalmente diversa, permitindo a sua classificação em pelo menos 95 serótipos distintos (revisto em [9]). Os serótipos diferem entre si no seu potencial para colonizar e também na sua capacidade para causar doença invasiva [8]. Alguns estudos sugerem que a capacidade invasiva do serótipo está inversamente relacionada com a duração da sua permanência na nasofaringe. Isto é, serótipos mais invasivos (como os serótipos 1 e 5) tendem a colonizar por períodos de tempo mais curtos, ao passo que serótipos com menor capacidade invasiva tendem a colonizar a nasofaringe por mais tempo e mais frequentemente, como é o caso dos serótipos 6A, 6B, 9V, 19A, 19F e 23F, por exemplo [10,11]. Contudo, esta situação nem sempre é verificada, podendo encontrar-se serótipos com alto poder invasivo associados a uma taxa de colonização frequente (serótipo 14, por exemplo) (revisto em [8,12]).

Além do serótipo, outros estudos indicam que existem fatores adicionais que contribuem para a capacidade invasiva de uma dada estirpe [8,13]. Alguns autores observaram a existência de uma grande heterogeneidade na capacidade invasiva de clones do mesmo

serótipo, o que sugere que o patrimônio genético da estirpe também contribui para o seu potencial invasivo [8].

Existem ainda pneumococos designados como não tipáveis (NT), por não serem reativos contra os anti-soros existentes na técnica de serotipagem por *Quellung*. As razões pelas quais estes pneumococos não são tipáveis podem ser diversas, sendo as mais frequentes a ausência do operão da cápsula, mutações genéticas ao nível deste *locus* ou até mesmo por possuírem novos tipos de cápsula, para os quais ainda não há soros específicos para a sua identificação [14].

1.1.3. Epidemiologia da colonização por *S. pneumoniae*

A bactéria *S. pneumoniae* integra a flora comensal do trato respiratório superior, à semelhança de muitos outros microrganismos, tais como *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* e outros estreptococos [5].

Para que a colonização ocorra, é necessário que haja uma primeira fase de aderência do pneumococo ao epitélio do trato respiratório, através da sua ligação aos carboidratos de superfície (N-acetil-glucosamina), sendo esta aderência mediada pela PsaA. Este processo é facilitado pela enzima neuraminidase, que ao diminuir a viscosidade do muco expõe os recetores de N-acetil-glucosamina das células epiteliais, permitindo-lhes a interação com as PsaA dos pneumococos [5].

Sabe-se que a colonização da nasofaringe por *S. pneumoniae* ocorre desde muito cedo, logo após o nascimento, permanecendo em níveis elevados durante os primeiros anos de vida [5]. Tal como se pode verificar pelo gráfico 1-1, o pico de colonização ocorre por volta dos cinco anos de idade, começando a decrescer na adolescência, até estabilizar a percentagem de colonização na ordem dos 10 a 20% na idade adulta. Atinge um valor mínimo nos idosos com mais de 75 anos [15].

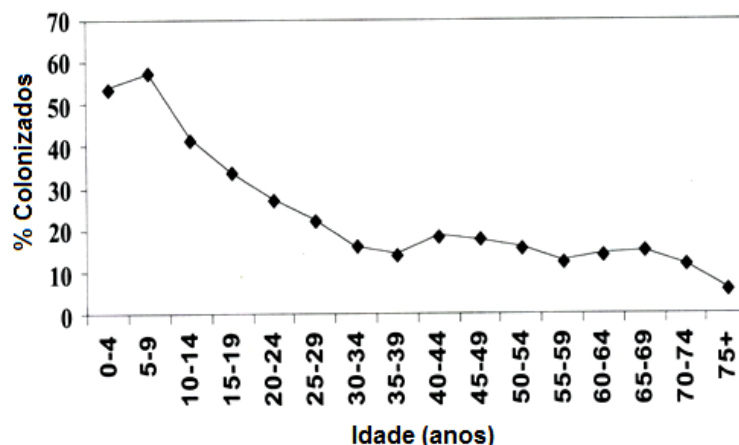


Gráfico 1-1: Prevalência de colonização por *S. pneumoniae* de acordo com a faixa etária, entre residentes de comunidades rurais no Alasca, entre 2000 e 2001. Adaptado de [15]

Se por um lado a colonização por *S. pneumoniae* em crianças tem sido alvo de diversos estudos, por outro lado ainda é escasso o conhecimento relativo aos padrões de colonização em adultos com mais de 60 anos. Até há relativamente pouco tempo, pensava-se que a taxa de colonização por *S. pneumoniae* nesta faixa etária era bastante baixa, 2 a 5% consoante dados obtidos em estudos que utilizaram métodos de detecção baseados em cultura [16-18]. Contudo, com o surgimento de novos métodos de diagnóstico molecular, tornou-se possível aumentar a sensibilidade no âmbito da detecção de pneumococos em colonização [19-22].

Os estudos de colonização por *S. pneumoniae* em idosos e a sua relação com a doença invasiva estão a ganhar uma importância crescente, na medida em que a esperança média de vida é cada vez mais elevada, tornando-se imperativa a melhoria da qualidade de vida nesta faixa etária. Ao incrementar o conhecimento nesta área torna-se também possível ter uma atuação mais eficaz ao nível da prevenção da doença invasiva, o que permitirá reduzir os elevados gastos económicos associados à pneumonia.

Na grande maioria dos casos, a colonização por *S. pneumoniae* é assintomática. Porém, conforme ilustrado na figura 1-3, a determinado momento pode progredir para doença [5]. Apesar de o espectro de serótipos mais frequentemente associados a colonização ser diferente dos que se encontram associados a doença invasiva, sabe-se que o desenvolvimento de doença é precedido pela colonização. Por este motivo, e também porque a colonização é fundamental para a transmissão da bactéria entre indivíduos e para a evolução da espécie, há um interesse cada vez maior nos estudos de colonização [23].

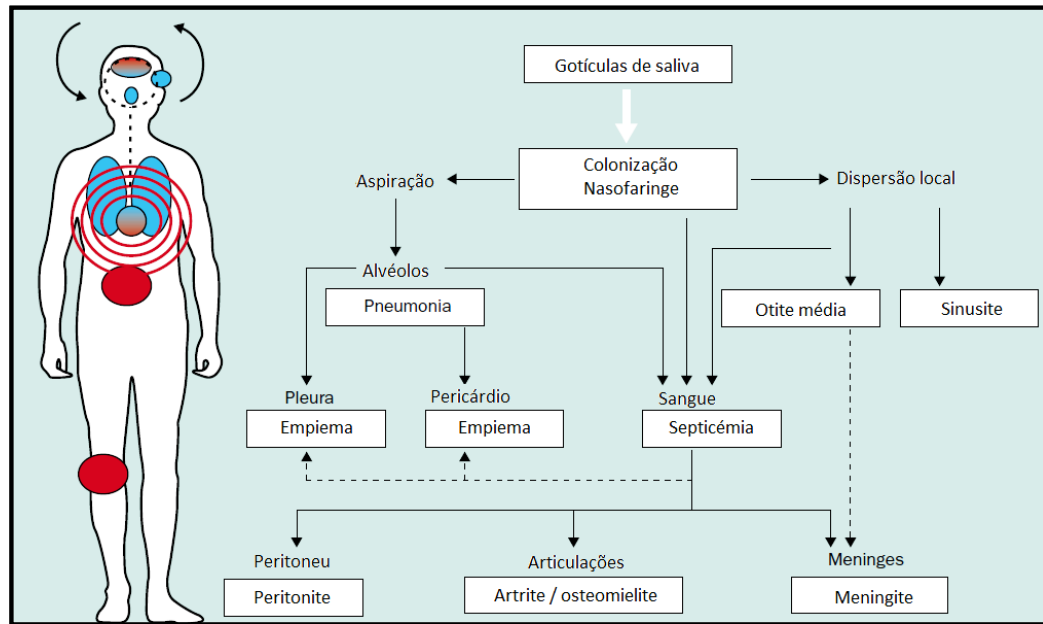


Figura 1-3: Via de disseminação e modos de infecção por *S. pneumoniae*.
Adaptado de [5]

O principal mecanismo de evolução em *S. pneumoniae* é a recombinação após transformação. Este processo exige a existência de DNA de pelo menos uma estirpe dadora e uma estirpe recetora [24]. O estudo da co-colonização (colonização simultânea por duas ou mais estirpes de *S. pneumoniae*) é também importante e revela-se uma área emergente [23].

1.1.4. Epidemiologia da doença invasiva pneumocócica (DIP)

Tal como já foi elucidado anteriormente, o modo de sobrevivência preferencial da bactéria *S. pneumoniae* é em colonização assintomática. Todavia, a determinado momento esta colonização pode evoluir para doença invasiva. Para que tal aconteça, tem que haver uma geração de citocinas inflamatórias que fazem não só alterar o tipo, mas também o número de recetores nas células do epitélio. Deste modo, os pneumococos que se encontravam somente aderidos à superfície das células epiteliais vão ser internalizados, migrando através do epitélio respiratório e endotélio vascular, resultando assim na invasão do hospedeiro pelas bactérias em causa [5].

S. pneumoniae é responsável por diversas patologias, sendo as mais frequentes a otite média, a sinusite e a bronquite. De menor incidência, mas com maior severidade encontram-se a meningite, a bacteriemia e a pneumonia (figura 1-4) [23].

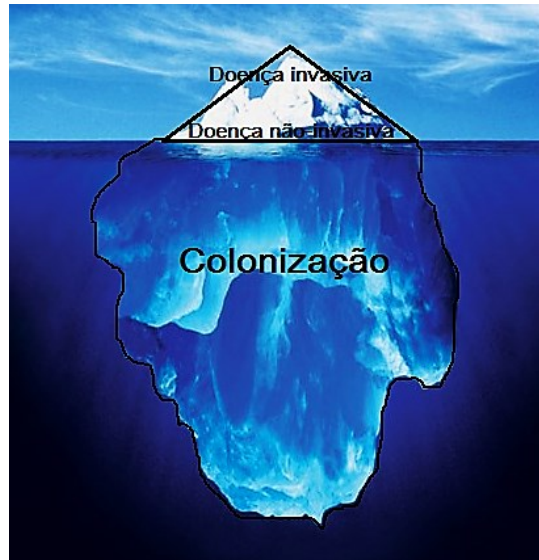


Figura 1-4: Representação ilustrativa da frequência / severidade da doença causada por *S. pneumoniae*. Adaptado de <http://cademeucamisa10.com/2015/08/20/falar-de-favorecimento-e-so-a-ponta-do-iceberg/>

S. pneumoniae é considerado um patógeno humano de elevada importância clínica, dado estar associado a uma elevada taxa de mortalidade e morbidade a nível mundial, em especial nas faixas etárias extremas, isto é, nas crianças com menos de 5 anos e nos adultos com mais de 65 anos (gráfico 1-2) [23]. Estima-se que *S. pneumoniae* seja a principal causa de cerca de 11% das mortes em crianças com menos de 5 anos de idade (excluindo as mortes por pneumococos em crianças VIH positivas), com números a rondar os 700.000 e 1.000.000 de mortes por ano em todo o mundo (revisto em [25]).

Relativamente às crianças até 5 anos de idade, pensa-se que a maior incidência de DIP esteja relacionada com a falta de maturidade do seu sistema imunitário, que não lhes possibilita uma defesa tão eficaz contra *S. pneumoniae*. Nos adultos com mais de 65 anos, torna-se mais difícil associar a causa da incidência elevada de DIP à colonização pela bactéria *S. pneumoniae*, estando esta incidência provavelmente relacionada com a maior heterogeneidade de patologias de base, o que aumenta a suscetibilidade do idoso ao desenvolvimento de DIP [23].

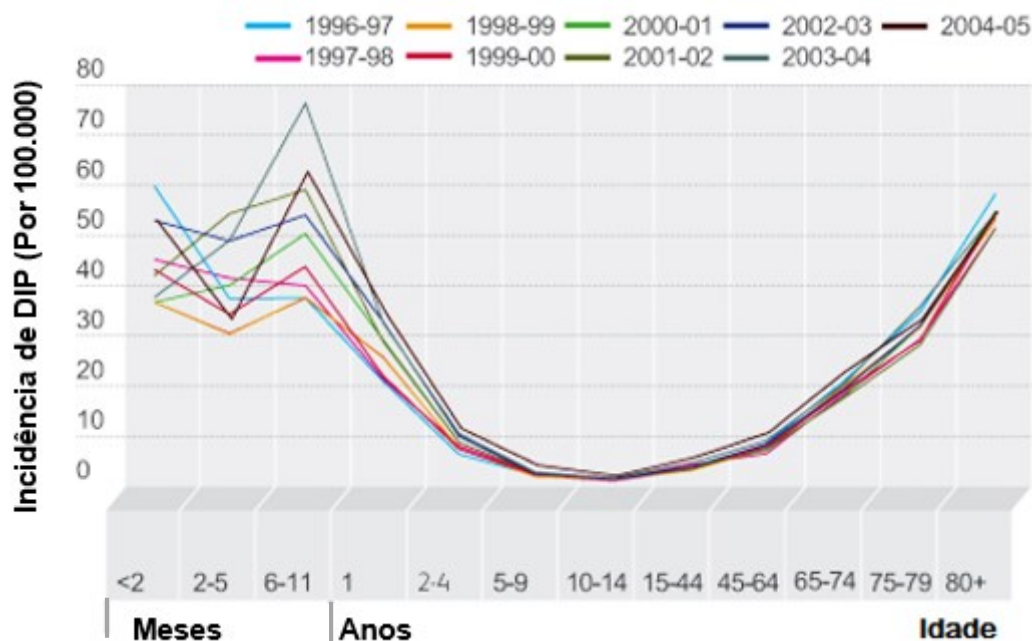


Gráfico 1-2: Incidência de doença invasiva pneumocócica relativamente à idade, em Inglaterra e País de Gales, entre 1996 e 2005.

Adaptado de <http://pfizervaccines.co.uk/hcp-home/learn/pneumococcal-disease/who-is-at-risk.aspx>

No que concerne à transmissão da bactéria *S. pneumoniae*, esta ocorre principalmente como resultado do contacto próximo entre pessoas, ou através de gotículas de saliva [3,26]. Neste sentido, vários estudos mostraram que uma elevada densidade populacional e espaços pouco ventilados são fatores de risco que mais facilmente propiciam a dispersão e transmissão desta bactéria, assumindo particular destaque neste âmbito as creches e os jardins-de-infância [3,26].

Uma vez que a densidade e frequência de colonização pneumocócica são mais elevadas na infância, pensa-se que este grupo etário será o vetor mais importante de transmissão da bactéria pela comunidade [5,27].

1.1.5. Vacinas pneumocócicas

Sabe-se atualmente que a vacinação é a melhor forma de prevenção da doença pneumocócica. Neste sentido, torna-se pertinente prevenir em primeiro lugar a colonização, pois deste modo não só se previne o desenvolvimento de doença invasiva, como também se previne a transmissão de pneumococos na comunidade.

Tendo por base os serótipos mais frequentemente associados a doença invasiva na população ativa nos Estados Unidos da América, surgiu em 2000, a primeira vacina conjugada pneumocócica (PCV) – PCV-7 (Prevenar 7, Pfizer®) [5,28]. Nesta vacina 7-valente os polissacáridos capsulares são conjugados com uma proteína altamente imunogénica (variante não tóxica da toxina diftérica – CRM₁₉₇), resultando numa resposta de memória imunitária por parte do hospedeiro aos serótipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F [29]. Esta vacina esteve disponível para a vacinação das crianças entre 2001 e 2009. Em 2009 foi lançada uma vacina 10-valente (Synflorix, GlaxoSmithKline®), sendo também uma vacina conjugada de polissacáridos capsulares que utiliza a proteína D como principal proteína transportadora. Em 2010 surgiu a vacina 13-valente (Prevenar 13, Pfizer®) [30], com a mesma formulação que a PCV-7. À data encontram-se licenciadas as três formulações da vacina: PCV-7, PCV-10 e PCV-13. Relativamente aos serótipos incluídos nas PCVs, a PCV-10 tem os mesmos serótipos da PCV-7 e adicionalmente os serótipos 1, 5 e 7F; por último, a PCV-13 tem os mesmos serótipos da PCV-10 e ainda os serótipos 3, 6A e 19A [29].

Atualmente, em Portugal, a vacina recomendada é a PCV-13, comercializada desde janeiro de 2010, cobrindo cerca de 80% dos atuais serótipos causadores de DIP em crianças com menos de 5 anos de idade [31]. A PCV-13 ficou também disponível para a vacinação de adultos a partir dos 50 anos desde 2012. A sua introdução no plano nacional de vacinação (PNV) é relativamente recente, tendo sido aprovada pelo Despacho nº 5786/2015, de 26 de maio, do Secretário de Estado Adjunto do Ministro da Saúde e publicado no Diário da República, 2ª série, nº 105, de 1 de junho de 2015. Uma vez englobada no PNV, esta vacinação é universal e gratuita para todas as crianças nascidas após o dia 1 de janeiro de 2015. É administrada segundo um esquema de três doses: uma primovacinação, que consiste em duas doses, uma administrada aos dois e outra aos quatro meses de idade, seguidas de um reforço único, aos doze meses. A vacina Prevenar 13® pode ainda ser administrada de forma gratuita aos grupos de risco para o desenvolvimento de DIP, descritos na norma 009/2015 de 01/06/2015.

Por último, no que concerne ao impacto das vacinas conjugadas pneumocócicas na população em geral, o que se sabe é que estas têm impacto em toda a biologia do pneumococo, quer seja ao nível de doença (invasiva ou não invasiva) quer também ao

nível da colonização. A vacinação tem implicações diretas nas crianças vacinadas, ao reduzir o risco de doença nesses indivíduos. Contudo, ao analisarmos a prevalência de colonização nesta faixa etária, esta mantém-se relativamente inalterada, uma vez que ocorre um fenómeno designado de substituição de serótipos (ou *serotype replacement*). Neste fenómeno, os serótipos abrangidos pela vacina, designados de serótipos vacinais, são substituídos por outros serótipos que não estão contemplados na formulação da vacina (serótipos não vacinais). Para além disso, a vacinação com este tipo de vacinas tem ainda um efeito indireto, que é bastante superior ao efeito direto - efeito de grupo (*herd effect*). Dado que a vacina confere proteção contra os serótipos vacinais, ao reduzir-se a colonização por estas estirpes de pneumococos, e igualmente a densidade e a duração da colonização, consequentemente reduzir-se-á a transmissão das mesmas pela comunidade, o que resulta num enorme efeito de grupo [23].

Dado que este trabalho se debruça sobre adultos com mais de 60 anos, torna-se ainda pertinente referir a existência de uma vacina que existe desde 1983 para indivíduos com mais de 2 anos, e que tem sido por vezes recomendada para adultos com mais de 65 anos: a vacina polissacárida pneumocócica 23-valente (Pneumovax 23, Merck®) (PPV-23). A PPV-23 é composta por preparações purificadas de polissacáridos capsulares de pneumococos, o que resulta na produção de anticorpos contra os serótipos contidos na vacina num período de duas a três semanas após a vacinação. É uma vacina muito menos eficaz na prevenção da doença pneumocócica, com uma fraca resposta em pessoas com doenças crónicas e imunocomprometidas, não tendo sido demonstrada qualquer eficácia em crianças com menos de dois anos de idade. Confere proteção contra 23 serótipos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F) [29,32].

1.2. Metodologias de detecção e identificação de *S. pneumoniae* utilizadas no âmbito desta tese

1.2.1. Detecção de *S. pneumoniae* pelo método convencional baseado na cultura em meio sólido

A metodologia convencional de detecção da bactéria *S. pneumoniae* praticada nos laboratórios de microbiologia faz-se em primeira instância com recurso à cultura do produto biológico num meio seletivo, tal como o *Trypticase Soy Agar* suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e gentamicina a 5 µg/ml (*Gentamicin Blood Agar* - GBA). As culturas são depois incubadas a 37° C durante a noite, em jarras de anaerobiose, até um período máximo de 48 horas. A identificação de *S. pneumoniae* baseia-se não só na sua aparência em termos morfológicos, bem como em quatro outras características fenotípicas principais: α -hemólise em cultura, ausência de produção de catalase, suscetibilidade à optoquina e solubilidade em desoxicolato de sódio [33].

São vantagens dos métodos convencionais o baixo custo do procedimento, a elevada especificidade, bem como a possibilidade de realização do teste de suscetibilidade aos antibióticos. Em contrapartida, estes métodos apresentam também desvantagens, principalmente ao nível da sensibilidade e tempo de obtenção de resultados, uma vez que exigem longos períodos de incubação [33].

Apesar do método de cultura continuar a ser o *gold standard* no diagnóstico da doença de etiologia pneumocócica, dadas as desvantagens apresentadas anteriormente surgiu a necessidade de desenvolvimento de novos métodos de detecção de *S. pneumoniae* mais sensíveis, nomeadamente as técnicas de diagnóstico molecular baseadas no uso da PCR [22].

No caso particular deste estudo, o uso das técnicas de diagnóstico molecular com uma sensibilidade superior revelou-se bastante pertinente, pelo facto das amostras estudadas serem exsudados da nasofaringe e orofaringe de indivíduos com mais de 60 anos, nas quais o isolamento de pneumococos é reduzido (< 5%) [16,21]. São exemplos destas técnicas de diagnóstico molecular, a reação em cadeia da polimerase (convencional e em tempo real), descritas em seguida.

1.2.2. Detecção dos genes de *S. pneumoniae* *lytA* e *piaA* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

A tecnologia de PCR em tempo real revela-se atualmente uma ferramenta de análise muito útil, dado que combina a amplificação e a detecção num único ensaio, através do uso de sondas marcadas com corantes fluorescentes [34].

A figura 1-5 representa um esquema simplificado do princípio de ação do método em causa. Como se pode verificar, a sonda além de estar marcada com o corante fluorescente dador a 5' (repórter), está também marcada com um corante recetor a 3' (*quencher*). Quando a sonda está intacta, o repórter ao ser excitado pela luz vai emitir fluorescência que, dada a proximidade com o *quencher*, vai ser de imediato absorvida. Este fenómeno é designado de *fluorescence resonance energy transfer* (FRET). O que acontece durante o processo de amplificação do DNA é que a enzima DNA polimerase ao ter atividade de exonuclease vai clivar a sonda, separando o repórter e o *quencher*. Como já não estão na proximidade um do outro, o repórter emite fluorescência. Quanto maior a quantidade de produto de PCR amplificado, maior a intensidade do sinal fluorescente emitido [34].

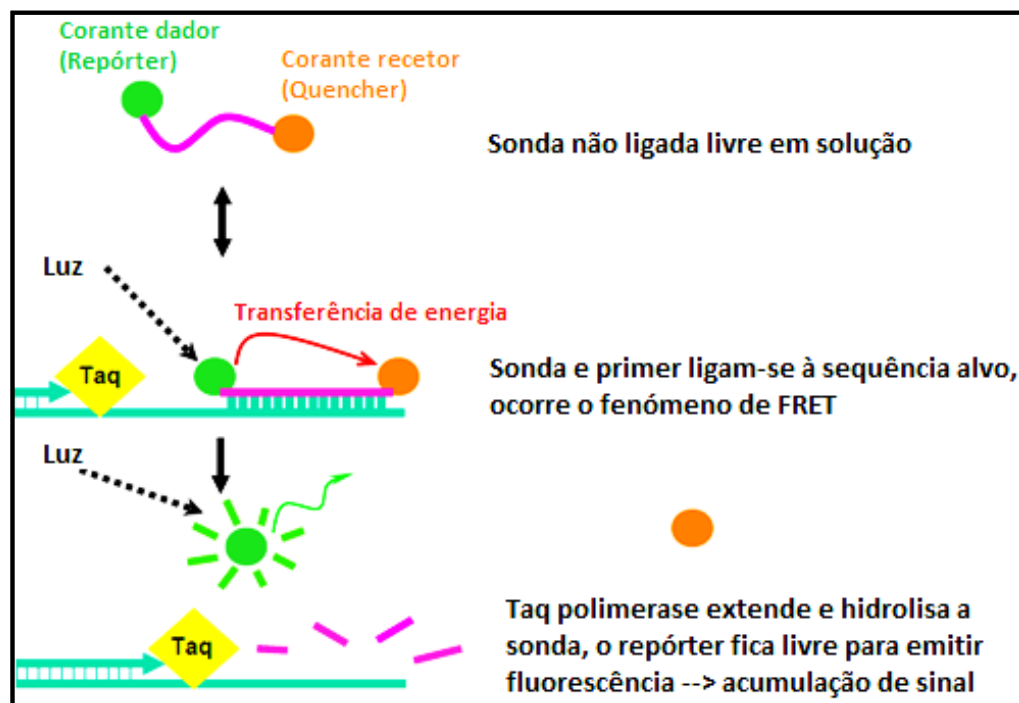


Figura 1-5: Princípio de ação do método de PCR em tempo real.

Adaptado de [34]

Em termos de análise dos resultados obtidos, os dados gerados pelos equipamentos de PCR em tempo real são fornecidos principalmente em dois formatos: os gráficos de amplificação (figura 1-6) e a correspondente tabela com os valores de *threshold cycle* (C_t) para cada amostra [34].

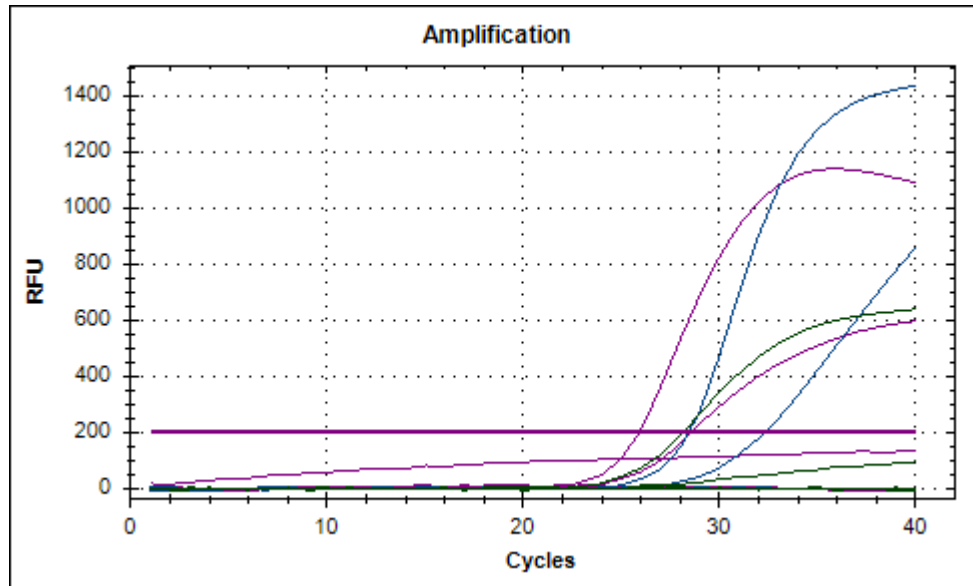


Figura 1-6: Gráfico de amplificação exemplificativo, gerado pelo equipamento de PCR em tempo real (número de ciclos de amplificação vs. unidades de fluorescência).

O C_t é definido como sendo o número de ciclos de PCR nos quais o sinal fluorescente detectado pelo equipamento ultrapassa o *threshold* (limite que distingue um sinal de detecção relevante do ruído de fundo). Assim, quanto menor o valor de C_t obtido, maior a quantidade de DNA alvo existente na amostra.

Atualmente, este é já um método que também é aplicável à determinação do tipo de cápsula de *S. pneumoniae*, o que permitiu ultrapassar algumas desvantagens que o método convencional (reação de *Quellung*) apresentava, nomeadamente: elevados custos dos anti-soros, necessidade de experiência técnica na observação dos resultados e subjetividade na interpretação, entre outros [34].

1.2.3. Determinação do tipo de cápsula por PCR convencional

O método de PCR foi desenvolvido no final dos anos 80 (1987) [35]. É um método sensível, que tem como objetivo fazer a amplificação de uma sequência específica de DNA alvo, que é exponencialmente amplificado através da repetição de três passos fundamentais:

1. **Desnaturação** do DNA em cadeia dupla;
2. **Hibridação** dos *primers* à sequência complementar na cadeia a amplificar;
3. **Extensão** dos *primers*, efetuada pela enzima DNA polimerase no sentido 5' – 3', de modo a produzir moléculas de DNA em cadeia dupla [34].

Uma vez decorrida a amplificação do DNA no termociclador, os produtos resultantes da reação de PCR podem ser detetados através de uma eletroforese em gel de agarose [34]. De um modo genérico, os géis de agarose são colocados a correr numa conformação horizontal, estando sujeitos a um campo elétrico constante e unidirecional, que fará com que as diferentes moléculas de DNA se separem de acordo com o seu tamanho molecular [36]. Em cada corrida devem sempre ser utilizados controlos positivos e um controlo negativo, bem como um marcador de peso molecular, que vai permitir a comparação das bandas obtidas com as bandas do marcador, das quais é sabido o respetivo tamanho molecular [34]. É também necessário utilizar-se um corante, o Brometo de Etídeo (EtBr), que é um agente intercalante do DNA e permitirá a visualização e análise das bandas obtidas quando expostas a radiação ultravioleta (UV), no transiluminador Geldoc, *software* Quantity One 4.5.2 (Bio-Rad®).

Existem vários fatores que influenciam a taxa de migração do DNA, tais como o tamanho molecular e conformação do DNA, a concentração da agarose, a voltagem aplicada, entre outros. No que diz respeito ao tamanho, as moléculas de DNA irão migrar através da matriz do gel de agarose, a uma taxa que é inversamente proporcional ao logaritmo decimal (\log_{10}) do número de pares de bases. Neste sentido, as moléculas menores migram mais, porque conseguem passar mais rápida e facilmente através da matriz do gel. Também a concentração da agarose influencia a migração das moléculas de DNA, de modo que matrizes mais concentradas tendem a facilitar a separação de fragmentos menores, ao passo que matrizes menos concentradas permitem a separação de fragmentos

de dimensões superiores. Relativamente à voltagem aplicada, é sugerido que para se obter uma máxima resolução dos fragmentos de DNA os géis de agarose não devem ser corridos a uma voltagem superior a 5 V/cm de gel [36].

No que concerne à interpretação dos resultados obtidos, o tamanho das bandas obtidas deverá corresponder ao tamanho molecular da banda do controlo positivo. A título de exemplo, ilustra-se na figura 1-7 um gel de eletroforese para serotipagem de *S. pneumoniae*. Na coluna mais à esquerda encontra-se o marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1 kb Plus – anexo I). O poço 1 corresponde ao controlo positivo (*S. pneumoniae*, serogrupo 7A/F, tamanho do produto de PCR 826 pares de bases (pb)). As bandas correspondentes aos poços 3 e 6 são coincidentes com as bandas do controlo positivo, o que indica que houve amplificação do produto esperado, isto é, trata-se de duas estirpes pertencentes ao serogrupo 7A/F. No caso dos poços 2, 4 e 5, não houve amplificação, o que significa que não são estirpes com serótipo 7A/F.

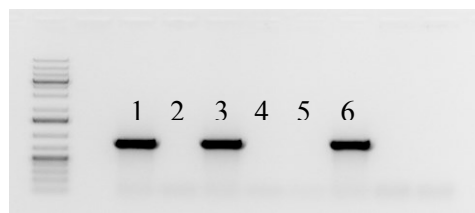


Figura 1-7: Exemplo de um gel de eletroforese.
Laboratório de Microbiologia Molecular de Patógenos Humanos (LMMPH)

1.3. Objetivos

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a prevalência de colonização da nasofaringe e orofaringe por *S. pneumoniae*, em adultos com idade superior a 60 anos, utilizando o método de diagnóstico de PCR em tempo real.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

1. Comparar os resultados obtidos por PCR em tempo real com o método convencional de cultura, ao nível de:
 - 1.1. Número total de portadores;
 - 1.2. Prevalência de colonização em cada uma das localizações anatómicas estudadas;

2. Identificar por PCR convencional os tipos de cápsulas de *S. pneumoniae* presentes nas amostras positivas e:
 - 2.1. Avaliar a distribuição e *ranking* de serótipos;
 - 2.2. Estimar a cobertura vacinal por PCV-13 e PPV-23.
 - 2.3. Comparar os resultados com os anteriormente obtidos após isolamento de estirpes de *S. pneumoniae* pelo método convencional de cultura.

De modo a atingir os objetivos definidos, foram estudadas duas coleções: uma coleção de amostras obtidas de 78 indivíduos residentes num lar de idosos, e uma segunda coleção constituída por amostras obtidas de 200 indivíduos, selecionada de forma aleatória a partir de uma coleção de amostras obtidas de mais de 3000 indivíduos no âmbito de um projeto anterior do laboratório (projeto *PneumoEL*).

2. Materiais e Métodos

2. Materiais e métodos

2.1. População e amostra

Neste estudo foram utilizadas amostras obtidas no âmbito do projeto de investigação *PneumoEL*, que decorreu entre 2010 e 2012 no Laboratório de Microbiologia Molecular de Patógenos Humanos (LMMPH), do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa (ITQB/UNL). O projeto *PneumoEL* foi um estudo transversal, que teve como principal objetivo a avaliação da prevalência de colonização por *S. pneumoniae* em adultos com idade superior a 60 anos, residentes numa área urbana (Oeiras) e numa área rural (Montemor-o-Novo).

Neste trabalho foram analisadas duas coleções distintas selecionadas do projeto *PneumoEL*. A primeira coleção continha as amostras obtidas de 78 indivíduos residentes num lar de idosos da área rural, no qual foi detetada uma elevada prevalência de colonização por *S. pneumoniae* durante o estudo *PneumoEL* (aproximadamente 17%). A segunda coleção consistiu nas amostras obtidas de 200 indivíduos (100 de cada uma das áreas geográficas), selecionadas de forma aleatória. Esta última coleção é assim uma amostra probabilística, uma vez que todos os indivíduos da população tiveram a mesma probabilidade de ser incluídos na amostra. Ao ser efetuada uma seleção aleatória restringiu-se assim uma das potenciais fontes de enviesamento dos resultados obtidos.

2.2. Declaração de ética

No decorrer do projeto *PneumoEL*, foram convidados a participar no estudo adultos com idade superior a 60 anos, com residência na área urbana ou rural. Após obtenção de consentimento informado, obtiveram-se dados sociodemográficos e clínicos, registados num questionário *standard*, através de uma breve entrevista. Quer os questionários, quer as respetivas amostras foram de imediato codificados com um número, e processados de forma totalmente anónima. Uma vez concluído o projeto, os dados foram definitivamente anonimizados não sendo possível a identificação dos participantes.

No âmbito desta tese utilizaram-se as amostras codificadas com um número, e armazenadas a -80°C no laboratório.

2.3. Trabalho de campo

2.3.1. Colheita das amostras biológicas

De cada participante foram recolhidos um exsudado da nasofaringe e um exsudado orofaríngeo. A colheita das amostras biológicas da nasofaringe e orofaringe foi efetuada com recurso a zaragatoas de algodão e viscase, respetivamente.

No caso do exsudado da nasofaringe, uma zaragatoa flexível foi passada via trans-nasal, paralelamente ao palato, até atingir a nasofaringe posterior (figura 2-1 (A)). No que concerne ao exsudado orofaríngeo, uma zaragatoa rígida foi passada trans-oralmente, de modo a alcançar a parede e os pilares da orofaringe (figura 2-1 (B)).

Uma vez efetuadas as colheitas, cada zaragatoa foi colocada em meio de transporte *Stuart*, e mantidas à temperatura ambiente entre 2 a 30 horas, sendo posteriormente processadas no laboratório (figura 2-2).

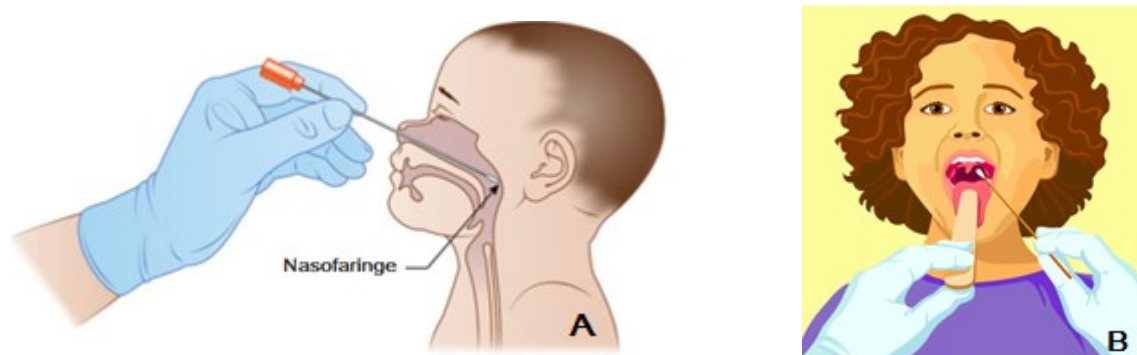


Figura 2-1: (A) Colheita de exsudado da nasofaringe (Adaptado de [37]);

(B) Colheita de exsudado orofaríngeo

(http://4.bp.blogspot.com/_H9LubDgwqVE/TOPrF_9y3DI/AAAAAAAAACM/y4fwqurY9aE/s1600/Rheumatic+Fever.gif)

2.3.2. Processamento das amostras biológicas

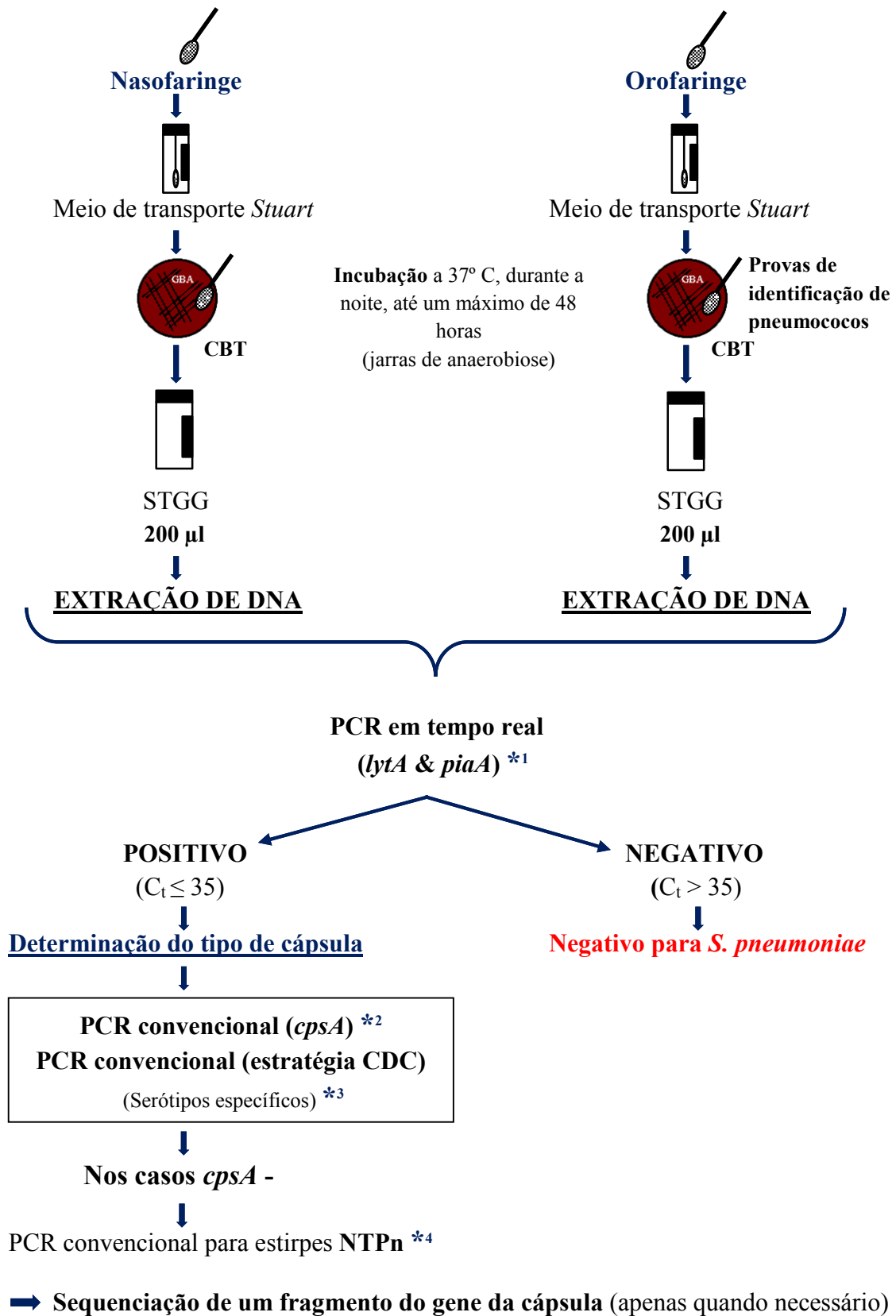


Figura 2-2: Metodologia aplicada ao processamento das amostras biológicas.

Por Sónia T. Almeida

*¹Anexo IV; *²Anexo V; *³Anexo VI; *⁴Anexo VII.

Aquando da chegada ao laboratório, ambas as zaragatoas foram retiradas do meio de transporte e semeadas, cada uma numa placa de *Trypticase Soy Agar* suplementada com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e gentamicina a 5 µg/ml (GBA), sendo depois incubadas a 37° C durante a noite, em jarras de anaerobiose, até um período máximo de 48 horas. Se findo o período de incubação não se obteve qualquer crescimento, a cultura foi considerada negativa para a presença de *S. pneumoniae* [37].

Após incubação, as colónias suspeitas de *S. pneumoniae* foram isoladas e identificadas pela sensibilidade à optoquina e solubilidade em DOC.

Nas placas com cultura positiva, foi ainda recolhido o crescimento bacteriano total (CBT), com recurso a uma ansa de 10 µl, sendo este conteúdo colocado num tubo de congelação com meio de *Skim milk Tryptone-Glucose-Glycerol* (STGG - preparação no anexo II).

Uma vez processados no laboratório, as zaragatoas e o CBT foram congelados e armazenados a -80° C.

O trabalho laboratorial no âmbito desta tese começou neste ponto. Os métodos adotados estão descritos nas secções seguintes e na figura 2-2 anteriormente apresentada está representado um esquema da estratégia seguida.

A cada uma das amostras de CBT (em STGG) foi efetuada a extração de DNA no equipamento automático *MagNA Pure Compact* (Roche®), tendo sido utilizado um volume inicial de 200 µl de amostra.

Cada um dos DNAs extraídos foi posteriormente submetido ao método de PCR em tempo real, para deteção dos genes pneumocócicos *lytA* e *piaA*. Os valores de C_t para cada amostra foram analisados segundo os critérios do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) [34]. Assim, todas as amostras com C_t inferior ou igual a 35 foram consideradas positivas e amostras com C_t superior a 40 foram consideradas negativas. As amostras com C_t compreendidos entre 36 e 40 foram consideradas “equivocas”, tendo sido sujeitas a duas diluições de 1:4 e 1:10 em água miliQ, de modo a reduzir potenciais inibidores que pudessem estar presentes. Se o valor de C_t diminuísse para valores iguais ou inferiores a 35, as amostras seriam consideradas positivas para *S. pneumoniae*. Sempre

que este valor se mantinha ou aumentava ainda mais, as amostras “equívocas” passavam a ser consideradas negativas.

Todas as amostras que se revelaram positivas no método de PCR em tempo real para a detecção de pneumococos foram posteriormente estudadas para a presença de um gene conservado do operão capsular (*cpsA*) por PCR convencional. Todas estas amostras foram ainda estudadas para a presença de genes específicos de vários tipos capsulares (num total de 42 serótipos/serogrupos), seguindo a metodologia proposta pelo CDC em PCR convencional [38]. No caso das amostras cujo resultado da PCR convencional para a presença do *cpsA* foi negativo, foi ainda realizada uma PCR convencional para identificação de estirpes não capsuladas, seguindo o método proposto por Simões *et al* [14]. Quando necessário, as amostras foram também submetidas à sequenciação de um fragmento do gene da cápsula.

2.3.3. Protocolos

a) Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com recurso ao equipamento *MagNA Pure Compact*. Existe um passo de lise prévia, que consiste em adicionar 200 µl de CBT a 200 µl de um tampão de lise específico (*MagNA Pure bacteria lysis buffer* – Roche, ref: 04659180001). Esta mistura é incubada durante 20 minutos a 37° C, estando depois em condições para a extração de DNA no referido equipamento automático.

É importante referir que em cada extração foi sempre incluída uma amostra de água, que foi posteriormente testada para a presença de contaminação por *S. pneumoniae* pelo método de PCR em tempo real, funcionando como controlo do processo de extração.

b) Detecção de *S. pneumoniae* por PCR em tempo real (*lytA* & *piaA*)

Para preparar a *master mix*, as concentrações e respetivos volumes de reagente a utilizar em cada reação encontram-se descritos na tabela 2-1.

No anexo III pode ser consultado o modo de preparação de *primers* e sondas.

Tabela 2-1: Volumes de reagente a utilizar na reação de PCR em tempo real para a detecção de *S. pneumoniae* (genes *lytA* & *piaA*). Adaptado de [19]

Reagente	[Final]	Volume tubo (µl)
<i>FastStart TaqMan Probe Master*</i>	1 X	12,5
<i>Primer Forward 10 µM (F)</i>	0,15 µM	0,375
<i>Primer Reverse 10 µM (R)</i>	0,15 µM	0,375
<i>Sonda 10 µM</i>	0,075 µM	0,1875
<i>Água miliQ</i>	-----	9,0625
Volume total		22,5

*Roche, ref: 04673409001

Após um período de cerca de 15 segundos de vórtex, pipetam-se 22,5 µl de *master mix* para cada tubo, seguido de 2,5 µl de DNA.

Relativamente às sequências de *primers* (F e R) e sondas (P) utilizadas descrevem-se no anexo IV.

As reações foram efetuadas no equipamento de PCR em tempo real BIORAD CFX-96, tendo sido utilizado o seguinte programa de PCR: 50° C durante 2 minutos, 95° C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos a 95° C durante 15 segundos e 60° C durante 1 minuto (adaptado de [19]) (figura 2-3).

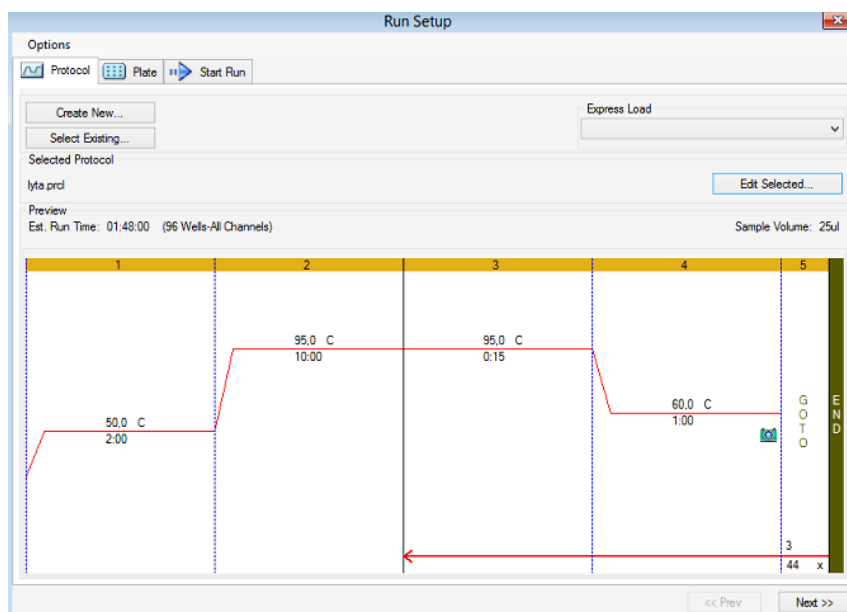


Figura 2-3: Programa de PCR utilizado para a detecção de *S. pneumoniae* (genes *lytA* & *piaA*).

Com o objetivo de assegurar a máxima fiabilidade dos resultados obtidos, ou seja, que não houve qualquer tipo de contaminação que originasse falsos positivos, em todos os ensaios foram sempre analisados um controlo positivo de *S. pneumoniae* (TIGR4) e um controlo negativo (*Streptococcus pseudopneumoniae* ATCC BAA-960). Estes controlos foram diluídos em água miliQ, para uma concentração final de 0,2 ng/μl. Também foram submetidos a análise controlos *non-template* (NTC), que contêm todos os reagentes, exceto a amostra de DNA (em vez disso utiliza-se o mesmo volume de água miliQ).

c) Determinação do tipo de cápsula por PCR convencional (estratégia CDC)

A estratégia de determinação do tipo de cápsula por PCR convencional em *multiplex* não é mais do que uma reação de PCR, na qual com uma só reação é possível determinar vários serótipos, com base na diferença de tamanho dos produtos de PCR obtidos.

As concentrações e volumes de reagente e DNA a utilizar em cada grupo reacional (GR), bem como a sequência dos *primers* utilizados, tamanho do produto de PCR e respetiva referência encontram-se descritos no anexo VI.

O programa de PCR utilizado foi sempre o mesmo em todos os GR: desnaturação a 94° C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94° C durante 30 segundos (desnaturação), 60° C durante 30 segundos (hibridação) e 72° C durante 1 minuto (extensão), terminando a 72° C durante 5 minutos.

Posteriormente os produtos de PCR foram analisados num gel de agarose a 2%, corado com EtBr e visualizado com recurso ao transiluminador Geldoc, *software* Quantity One 4.5.2 (Bio-Rad®).

Em todos os ensaios foram sempre analisados um controlo positivo para cada serótipo e um controlo negativo (água), além das amostras a serotipar.

d) PCR convencional para detecção de estirpes NTPn

Para preparar a *master mix*, as concentrações e respetivos volumes de reagente a utilizar em cada reação encontram-se descritos na tabela 2-2.

Tabela 2-2: Volumes de reagente a utilizar na reação de PCR convencional para detecção de estirpes NTPn. [14]

Reagentes	[Stock]	[Tubo]	Volume tubo (µl)
H ₂ O	-----	-----	2,3
Tampão <i>Go Taq</i>	5 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1
dNTPs	2 mM	0,12 mM	0,6
<i>Primer Mix aliB₂</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix cpsA</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix lytA</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 16S rRNA</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Go Taq</i>	5 U/µl	0,05 U/µl	0,1

No caso específico deste ensaio, a sequência dos *primers* utilizados está descrita no anexo VII.

O programa de PCR utilizado foi o seguinte: um passo de desnaturação a 94° C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos a 94° C durante 30 segundos (desnaturação), 52° C durante 45 segundos (hibridação) e 72° C durante 1 minuto (extensão), terminando a 72° C durante 5 minutos.

Posteriormente os produtos de PCR foram analisados num gel de agarose a 2%, corado com EtBr e visualizado com recurso ao transiluminador Geldoc, *software* Quantity One 4.5.2 (Bio-Rad®).

No ensaio foram sempre analisadas estirpes controlo juntamente com as amostras a tipar. Os controlos foram: uma estirpe capsulada, um *Streptococcus of the mitis group* (SMG) e uma estirpe não tipável [14].

e) Sequenciação de um fragmento do gene da cápsula

Nas amostras em que houve necessidade de fazer sequenciação do fragmento do gene da cápsula, foi realizada uma reação de PCR em *uniplex*, tendo como gene alvo o serótipo específico da cápsula que se pretende identificar.

Tabela 2-3: Volumes de reagente a utilizar na reação de PCR para posterior sequenciação do fragmento do gene da cápsula.

Reagentes	[Stock]	[Tubo]	Volume Tubo (µl)
H ₂ O	-----	-----	21,75
Tampão <i>Go Taq</i>	5 X	1 X	10
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	5
dNTPs	2 mM	0,12 mM	3
<i>Primer Mix</i> Serótipo "X"	10 pmol/µl	1 pmol/µl	5
<i>Go Taq</i>	5 U/µl	0,025 U/µl	0,25
DNA	-----	-----	5

Por último, uma vez realizado o PCR, as amostras de DNA foram purificadas segundo o protocolo abaixo descrito, e posteriormente enviadas para a empresa MacroGen, localizada em Amsterdão (Holanda), que se encarregou do processo de sequenciação.

Uma vez recebidas as sequências dos genes, a sua análise foi feita com recurso ao programa informático *DNAStar* (Lasergene, Madison, EUA).

➤ **Purificação – Protocolo ExoSAP**

De acordo com a empresa Macrogen, 10-15 µl de produto de PCR purificado é suficiente para sequenciar e re-sequenciar, se necessário.

O protocolo de purificação pelo método de ExoSAP é o seguinte:

1. A 15 µl de DNA amplificado anteriormente por PCR adiciona-se 3 µl de Exonuclease I (Exo) (1 U/µl) e 3 µl de *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (1 U/µl). Neste ponto foram utilizadas as soluções de trabalho (anexo VIII).
2. As amostras foram incubadas no termociclador 30 minutos a 37° C, seguidos de 20 minutos a 80° C.

As amostras encontram-se purificadas.

2.4. Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada com recurso ao teste de Chi-quadrado (χ^2). Foi considerado um intervalo de confiança de 95%, pelo que se atribuiu significância estatística sempre que o valor de p foi $\leq 0,05$.

3. Resultados

3. Resultados

No capítulo anterior foi referido que neste estudo se analisaram duas coleções de dados distintas. Como tal, apesar de terem sido processadas nas mesmas condições e com os mesmos objetivos, para uma melhor compreensão dos resultados obtidos, estes são aqui apresentados de forma independente.

3.1. Caracterização das coleções

3.1.1. Coleção: Lar de idosos

A coleção correspondente ao lar de idosos foi constituída pelas amostras de 78 indivíduos residentes neste local. Foram analisadas todas as amostras em que houve crescimento na placa primária (GBA): 24 da nasofaringe e 78 da orofaringe.

3.1.2. Coleção: Amostra aleatória

A coleção correspondente à amostra aleatória foi constituída pelas amostras de 200 indivíduos selecionados aleatoriamente a partir de uma população de cerca de 3200 voluntários. Foram analisadas todas as amostras em que houve crescimento na placa primária (GBA): 48 da nasofaringe e 199 da orofaringe.

3.2. Análise descritiva dos dados obtidos

3.2.1. Detecção de *S. pneumoniae* pelo método convencional de cultura em meio sólido (no âmbito do projeto *PneumoEL*) versus detecção de *S. pneumoniae* por PCR em tempo real (*lytA* & *piaA*)

Com o objetivo avaliar a sensibilidade dos métodos de detecção de *S. pneumoniae*, bem como comparar a prevalência de colonização por *S. pneumoniae* obtida em ambos os métodos, são aqui apresentados graficamente os resultados obtidos.

No anexo IX é ainda possível consultar-se a tabela com os valores de C_t detalhados para cada amostra, obtidos na detecção de *S. pneumoniae* por PCR em tempo real, assim como o respetivo resultado qualitativo obtido em cultura.

Cada ponto representado nos gráficos 3-1 e 3-2 constitui uma amostra, sendo a sua posição determinada pelo valor de C_t obtido para cada um dos genes, *lytA* e *piaA*.

a) Coleção: Lar de idosos

Das 24 amostras da nasofaringe estudadas, 12 foram consideradas negativas para a presença de pneumococos, pois não houve amplificação de nenhum dos genes pesquisados (*lytA* e *piaA*). Pelo mesmo motivo, das 78 amostras da orofaringe analisadas, 65 foram consideradas negativas.

No gráfico 3-1 são apresentados os resultados das amostras nas quais houve amplificação dos genes *lytA* e *piaA* por PCR em tempo real. Quanto às amostras da nasofaringe, foi detetada a presença de pneumococos por PCR em tempo real em 12 amostras, todas anteriormente positivas por cultura. Quanto às amostras da orofaringe, foi detetada a presença de pneumococos por PCR em tempo real em 13 das 78 amostras. Destas, apenas 3 tinham sido previamente positivas por cultura.

De um modo geral, os valores de C_t obtidos para os genes *lytA* e *piaA* são concordantes, não variando mais de dois C_t um do outro.

Torna-se ainda pertinente destacar que tendencialmente se observaram valores de C_t inferiores para as amostras da nasofaringe face às amostras da orofaringe.

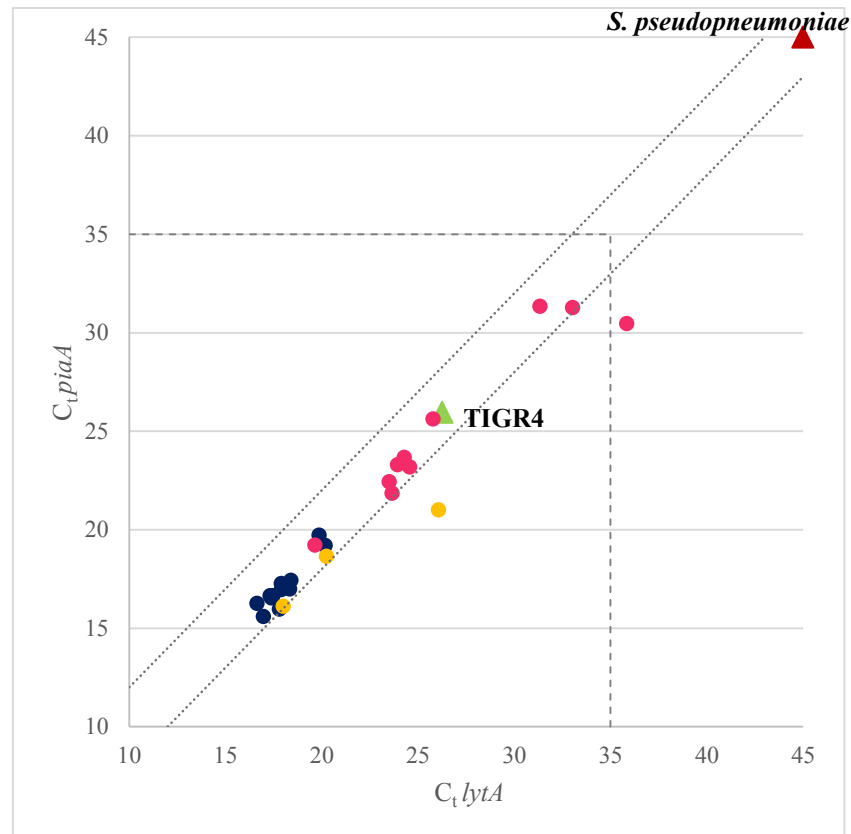


Gráfico 3-1: Detecção por PCR em tempo real (*lytA* e *piaA*) de *S. pneumoniae* no crescimento bacteriano total de exsudado nasofaríngeo (N) e orofaríngeo (O), dos indivíduos residentes no lar de idosos.

● N (Positivos por cultura); ● O (Positivos por cultura); ● O (Negativos por cultura);
 ---- Valores de *cut-off* para discriminar entre amostras positivas e negativas;
 / Limite do desvio de dois C_t entre os valores obtidos para ambos os genes pneumocócicos.

b) Coleção: Amostra aleatória

Das 48 amostras da nasofaringe estudadas, 40 foram consideradas negativas para a presença de pneumococos, pois não houve amplificação de nenhum dos genes pesquisados (*lytA* e *piaA*). Pelo mesmo motivo, das 199 amostras da orofaringe analisadas, 186 foram consideradas negativas.

No gráfico 3-2 são apresentados os resultados das amostras nas quais houve amplificação dos genes *lytA* e *piaA* por PCR em tempo real. Quanto às amostras da nasofaringe, foi detetada a presença de pneumococos por PCR em tempo real em 8 amostras, das quais 7 já tinham sido previamente positivas por cultura. Quanto às amostras da orofaringe, foi detetada a presença de pneumococos por PCR em tempo real em 13 das 199 amostras, todas anteriormente negativas por cultura.

De um modo geral, os valores de C_t entre os genes *lytA* e *piaA* são concordantes, não variando mais de dois C_t um do outro.

Torna-se ainda pertinente destacar que, também na amostra aleatória, tendencialmente se observam valores de C_t inferiores para as amostras da nasofaringe face às amostras da orofaringe.

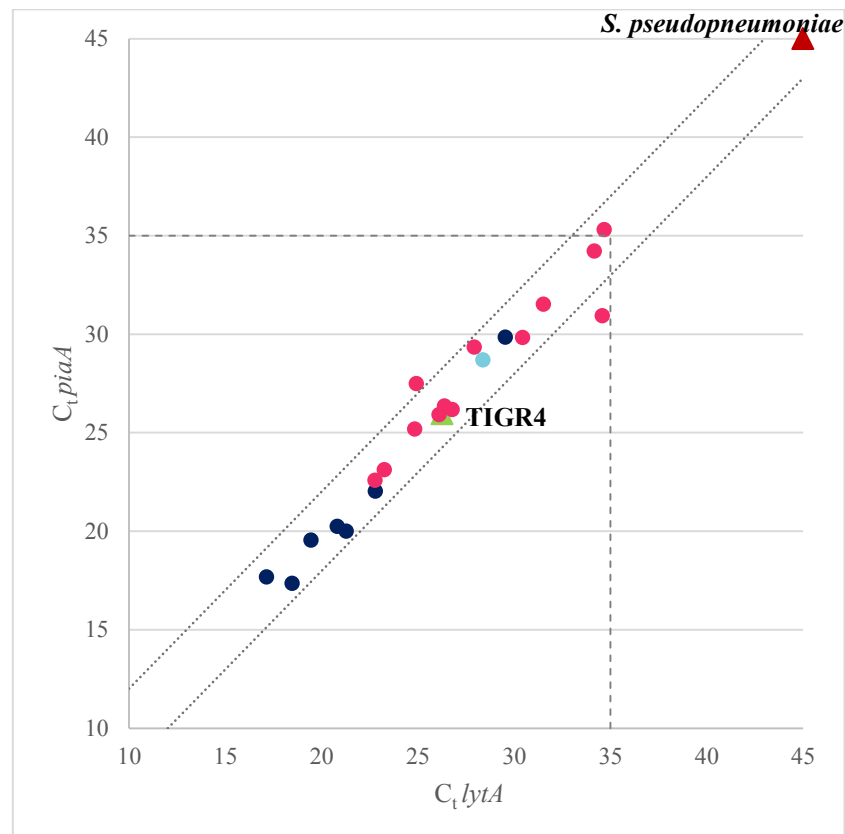


Gráfico 3-2: Detecção por PCR em tempo real (*lytA* e *piaA*) de *S. pneumoniae* no crescimento bacteriano total de exsudado nasofaríngeo (N) e orofaríngeo (O), dos indivíduos pertencentes à amostra aleatória.

- N (Positivos por cultura); ● N (Negativos por cultura); ● O (Negativos por cultura);
- Valores de *cut-off* para discriminar entre amostras positivas e negativas;
- Limite do desvio de dois C_t entre os valores obtidos para ambos os genes pneumocócicos.

3.2.2. Tipo de cápsula de *S. pneumoniae*

Para ambas as coleções, a estratégia adotada descreve-se de seguida. Todas as amostras com resultados positivos (apresentados nos gráficos 3-1 e 3-2 e listados nas tabelas IX-1 e IX-2 em anexo) foram estudadas para a presença de um gene conservado do operão capsular (*cpsA*) por PCR convencional. Todas estas amostras foram ainda estudadas para a presença de genes específicos de vários tipos capsulares (num total de 42 serótipos/serogrupos), seguindo a metodologia proposta pelo CDC em PCR convencional [38]. No caso das amostras cujo resultado da PCR convencional para a presença do *cpsA* foi negativo, foi ainda realizada uma PCR convencional para identificação de estirpes não capsuladas, seguindo o método proposto por Simões *et al* [14].

Quando numa dada amostra o serótipo detetado foi o mesmo que o serótipo detetado no projeto *PneumoEL*, considerou-se o resultado obtido, não tendo sido realizados mais ensaios. Procedeu-se da mesma forma nos casos em que num dado portador, numa localização anatómica já tinha sido detetado um serótipo (no projeto *PneumoEL*), e o serótipo agora detetado por PCR convencional na outra localização anatómica foi o mesmo. Nos restantes casos, isto é, quando numa amostra anteriormente dada como negativa por cultura no projeto *PneumoEL*, e ainda quando numa dada amostra foram detetados serótipos adicionais aos anteriormente detetados no projeto *PneumoEL*, realizou-se a sequenciação do fragmento de PCR amplificado para o gene capsular e comparou-se a sequência obtida com uma sequência de referência.

a) **Coleção: Lar de idosos**

Na presente secção apresentam-se os resultados obtidos ao nível da determinação do tipo de cápsula para as 12 amostras da nasofaringe e 13 amostras da orofaringe positivas para a presença de *S. pneumoniae*.

Na tabela 3-1 encontram-se listados os resultados obtidos nesta fase do estudo. Como se pode constatar, todos os serótipos que foram detetados previamente no projeto *PneumoEL* utilizando a cultura, foram também neste estudo detetados com recurso ao DNA extraído a partir do crescimento bacteriano total.

De destacar a amostra 1794G que foi excluída nesta fase, por ter resultados incongruentes entre as diferentes metodologias. Por um lado teve valores positivos na detecção de *S. pneumoniae* pelo método de PCR em tempo real para os genes *lytA* e *piaA*, embora com valores de C_t quase *borderline* (33,03 para o gene *lytA*, e 31,28 para o gene *piaA*). Contudo, ao pesquisar a presença do gene *cpsA* foi dada como negativa, pelo que se realizou a PCR para estirpes não capsuladas. Neste último ensaio a amostra foi novamente negativa para *cpsA*, tendo apresentados também resultados negativos para o gene *lytA*. Apenas se detetou a presença do gene *aliB2*. Globalmente, os vários resultados obtidos para esta amostra sugeriram que esta seria negativa para a presença de *S. pneumoniae*.

No que concerne às amostras submetidas a sequenciação, os resultados detalhados em termos de homologia dos produtos de PCR com as sequências controlo encontram-se descritos na tabela 3-2. A título de exemplo, as figuras 3-1 (A) e 3-1 (B) representam excertos da análise dos resultados de sequenciação.

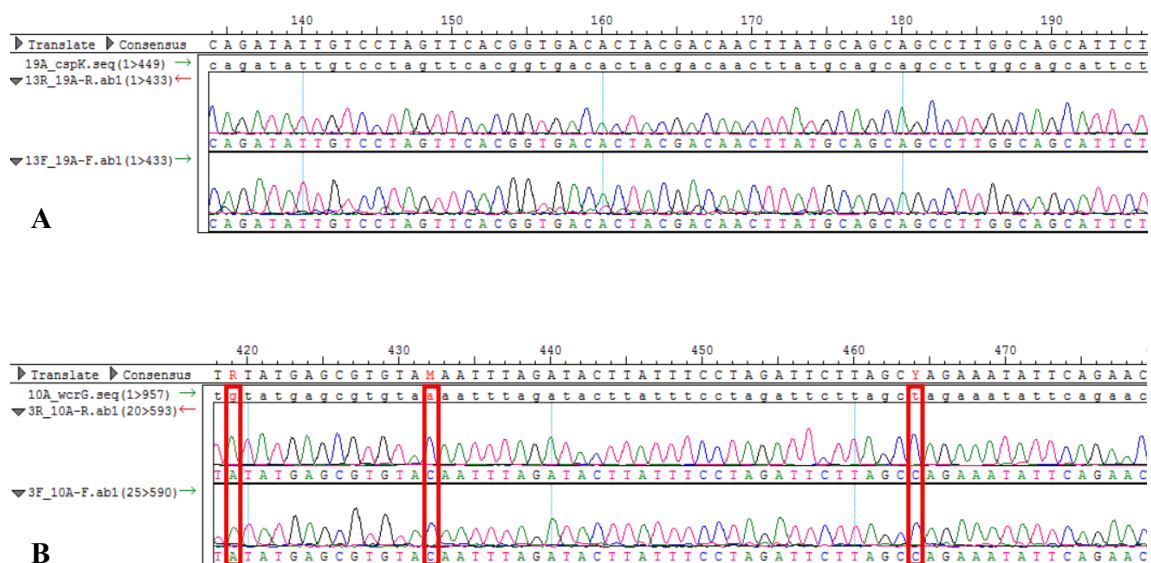


Figura 3-1: (A) Análise dos resultados da sequenciação – estirpe com 100% de homologia com a estirpe de referência. (B) Análise dos resultados da sequenciação – estirpe com 92% de homologia com a estirpe de referência, não correspondendo ao serótipo em causa.

Tabela 3-1: Resultados da determinação do tipo de cápsula, das amostras positivas para a presença de *S. pneumoniae*, correspondentes aos indivíduos residentes no lar de idosos.

Amostra	Resultado obtido <i>PneumoEL</i>	PCR <i>cpsA</i>	PCR NTPn	PCR (CDC)	Sequenciação do gene da cápsula	Conclusão acerca da estirpe
1736N	19A	Positivo	NR	19A	NR	19A
1741G	ND	Positivo	NR	19A	19A	19A
1742N	23A	Positivo	NR	SG23	NR	SG23
1768G	ND	Positivo	NR	10A / 19A	10A excluído	19A
1770N	17F	Positivo	NR	17F	NR	17F
1770G	ND	Positivo	NR	17F	NR	17F
1777N	23A	Positivo	NR	SG23	NR	SG23
1778G	ND	Positivo	NR	19A	19A	19A
1785N	19A	Positivo	NR	19A	NR	19A
1785G	ND	Positivo	NR	10A / 19A*	10A excluído	19A
1786N	23A	Positivo	NR	SG23	NR	SG23
1786G	ND	Positivo	NR	10A	10A excluído	Pn -Serótipo ND
1788N	6C	Positivo	NR	SG6	NR	SG6
1788G	6C	Positivo	NR	SG6	NR	SG6
1790N	19A	Positivo	NR	19A	NR	19A
1790G	19A	Positivo	NR	19A	NR	19A
1791N	19A	Positivo	NR	19A	NR	19A
1791G	ND	Positivo	NR	19A	NR	19A
1793G	23A	Positivo	NR	SG23	NR	SG23
1794N	19A	Positivo	NR	19A	NR	19A
1794G	ND	Negativo	Negativo	S/A	NR	Negativo para pn
1799N	22F	Positivo	NR	22F/A	NR	22F/A
1799G	ND	Positivo	NR	19A	19A	19A
1804N	19A	Positivo	NR	19A	NR	19A
1804G	ND	Positivo	NR	10A / 19A*	10A excluído	19A

NR – Não realizada; ND – Não detetado; S/A – Sem amplificação.

19A * – não sequenciado.

A sombreado encontra-se a amostra excluída, por ter sido posteriormente considerada negativa para a presença de *S. pneumoniae*.

Só se considerou positivo o resultado para o serótipo quando o produto de PCR tinha 100% de homologia com a estirpe de referência [20].

Identificaram-se 4 amostras com o serótipo 10A que se revelaram todas falsos positivos para aquele tipo de cápsula após sequenciação. Todas as amostras identificadas como serótipo 19A tinham 100% de homologia com a estirpe de referência, tendo sido consideradas *S. pneumoniae* do serótipo 19A.

Tabela 3-2: Amostras correspondentes aos indivíduos residentes no lar de idosos que foram submetidas a sequenciação do fragmento do gene da cápsula.

Estirpe	Serótipo submetido a sequenciação	Accession Number da estirpe controlo [39]	Semelhança entre o produto de PCR e a sequência da estirpe de referência (%)
1741G	19A	GenBank: CR931675.1 (gene <i>cpsK</i>)	100%
1768G	10A	GenBank: CR931649.1 (gene <i>wcrG</i>)	94%
1768G	19A	GenBank: CR931675.1 (gene <i>cpsK</i>)	100%
1778G	19A	GenBank: CR931675.1 (gene <i>cpsK</i>)	100%
1785G	10A	GenBank: CR931649.1 (gene <i>wcrG</i>)	96%
1786G	10A	GenBank: CR931649.1 (gene <i>wcrG</i>)	96%
1799G	19A	GenBank: CR931675.1 (gene <i>cpsK</i>)	100%
1804G	10A	GenBank: CR931649.1 (gene <i>wcrG</i>)	97%

Por último, o gráfico 3-3 sumariza o *ranking* dos serótipos obtidos, no total das 24 amostras consideradas positivas para a presença de *S. pneumoniae* nos indivíduos residentes no lar de idosos.

Das 24 amostras nas quais foi detetado *S. pneumoniae* pelo método de PCR em tempo real, numa amostra não foi possível obter qualquer serótipo por PCR convencional. Contudo, foi considerada positiva para a presença de *S. pneumoniae* dado que houve amplificação dos genes pneumocócicos *lytA* e *piaA* e tinha a presença do gene *cpsA*.

O serótipo mais prevalente no lar de idosos foi o 19A (58,3%), estando este serótipo contemplado em ambas as vacinas PCV-13 e PPV-23.

Relativamente ao SG23 (16,7%), não foram detetados os serótipos específicos dentro deste grupo. Assumindo que se tratava do mesmo serótipo que o que foi detetado no *PneumoEL*, estes 4 casos pertencerão ao serótipo 23A, que não está contemplado nas vacinas disponíveis.

No caso do SG6 (8,3%), também não foram detetados os serótipos específicos dentro deste grupo. Assumindo que se tratava do mesmo serótipo que o que foi detetado no *PneumoEL*, estes 2 deveriam ser do serótipo 6C, que também não está contemplado nas vacinas disponíveis.

Os restantes serótipos detetados, 17F (8,3%) e 22F/A (22F, assumindo que se trata do mesmo serótipo que o que foi detetado no *PneumoEL*) (4,2%) encontram-se contemplados na vacina PPV-23 mas não na PCV-13.

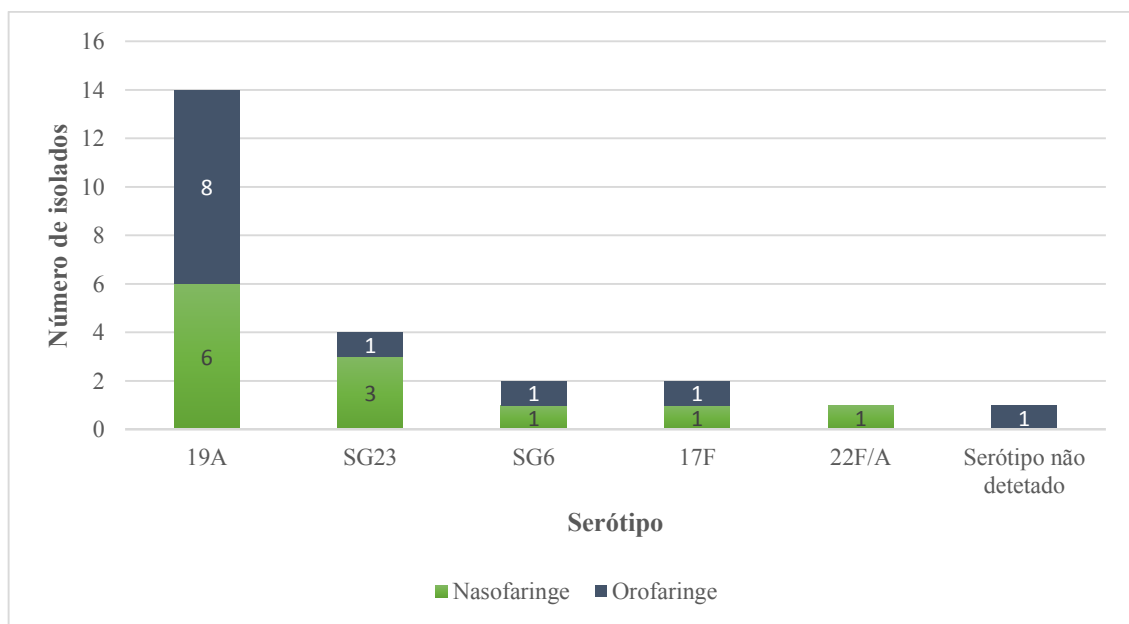


Gráfico 3-3: Diversidade de serótipos de *S. pneumoniae* detetados por PCR convencional (estratégia do CDC), das amostras referentes aos indivíduos residentes no lar de idosos.

b) Coleção: Amostra aleatória

Na presente secção apresentam-se os resultados obtidos ao nível da determinação do tipo de cápsula das 8 amostras da nasofaringe e 13 amostras da orofaringe positivas para a presença de *S. pneumoniae*.

Na tabela 3-3 encontram-se os resultados obtidos nesta fase do estudo. Como se pode constatar, houve 2 amostras nas quais foi detetado um serótipo no *PneumoEL*, e que neste estudo utilizando o DNA extraído não foi possível atribuir-lhes um serótipo (390N-serótipo 31 e 2760N - serótipo 3). Apesar destes serótipos estarem contemplados na estratégia utilizada, não houve sucesso na amplificação destes genes capsulares nesta fase do estudo.

De destacar a amostra 1892G que foi excluída nesta fase, por ter resultados incongruentes entre as diferentes metodologias. Por um lado teve valores positivos na deteção de *S. pneumoniae* pelo método de PCR em tempo real para os genes *lytA* e *piaA*, embora com valores *borderline* (34,17 para o gene *lytA* e 34,22 para o gene *piaA*). Contudo, ao pesquisar a presença do gene *cpsA* foi dada como negativa, pelo que se realizou a PCR para estirpes não capsuladas. Neste último ensaio a amostra foi novamente negativa para *cpsA*, tendo apresentados também resultados negativos para o gene *lytA*. Apenas se detetou a presença do gene *aliB2*. Globalmente, os vários resultados obtidos para esta amostra sugeriram que esta seria negativa para a presença de *S. pneumoniae*.

No que concerne às amostras submetidas a sequenciação, os resultados detalhados em termos de homologia dos produtos de PCR com as sequências controlo encontram-se descritos na tabela 3-4.

Tal como sucedeu com a coleção anterior, só se considerou positivo o resultado para o serótipo quando o produto de PCR tinha 100% de homologia com a estirpe de referência [20].

Identificaram-se 3 amostras com o serótipo 24 cujo resultado da sequenciação foi inconclusivo uma vez que o produto de PCR era muito pequeno, apenas 99 pares de bases, não fazendo o emparelhamento com a sequência controlo. Foram ainda detetadas 2 amostras com serótipo 10A e uma com o serótipo 22F/A que se revelaram falsos positivos para aqueles tipos de cápsula após sequenciação.

Houve uma amostra identificada como serótipo 10A que obteve 100% de homologia com a estirpe controlo para este gene capsular, tendo sido considerada *S. pneumoniae* do serótipo 10A.

Tabela 3-3: Resultados da determinação do tipo de cápsula, das amostras positivas para a presença de *S. pneumoniae*, correspondentes aos indivíduos pertencentes à amostra aleatória.

Amostra	Resultado obtido <i>PneumoEL</i>	PCR <i>cpsA</i>	PCR NTPn	PCR (CDC)	Sequenciação do gene da cápsula	Conclusão acerca da estirpe
236N	9L	Positivo	NR	9N/L	NR	9N/L
390N	31	Positivo	NR	S/A	NR	Pn - Serótipo ND
421N	3	Positivo	NR	3	NR	3
456G	ND	Positivo	NR	10A	10A	10A
670N	6A	Positivo	NR	SG6	NR	SG6
670G	ND	Positivo	NR	SG6	NR	SG6
786G	ND	Positivo	NR	S/A	NR	Pn - Serótipo ND
982G	ND	Positivo	NR	S/A	NR	Pn - Serótipo ND
1192G	ND	Positivo	NR	24	Inconclusivo	Pn - Serótipo ND
1278N	23B	Positivo	NR	SG23	NR	SG23
1313G	ND	Positivo	NR	15A/F	15A	15A
1314N	ND	Positivo	NR	SG6	6C	6C
1314G	ND	Positivo	NR	24 / SG6	Inconclusivo para o 24; 6C	6C
1892G	ND	Negativo	Negativo	S/A	NR	Negativo para pn
1908G	ND	Positivo	NR	10A	10A excluído	Pn - Serótipo ND
2012N	23A	Positivo	NR	SG23	NR	SG23
2062G	ND	Positivo	NR	22F/A	22F/A excluído	Pn - Serótipo ND
2097G	ND	Positivo	NR	24	Inconclusivo	Pn - Serótipo ND
2760N	3	Positivo	NR	S/A	NR	Pn - Serótipo ND
2800G	ND	Positivo	NR	10A	10A excluído	Pn - Serótipo ND
3171G	ND	Positivo	NR	S/A	NR	Pn - Serótipo ND

NR – Não realizada; ND – Não detetado; S/A – Sem amplificação.

A sombreado encontra-se a amostra excluída, por ter sido posteriormente considerada negativa para a presença de *S. pneumoniae*.

Relativamente à amostra 1313G, identificada como tendo o serótipo 15A/F, foi considerada como positiva para a presença de *S. pneumoniae* do serótipo 15A. O mesmo se passou com as amostras 1314N e 1314G (SG6) nas quais foi possível identificá-las como tendo o serótipo 6C após a sequenciação, uma vez que a amostra em estudo apresentava 100% de homologia com a sequência controlo para o gene correspondente ao serótipo 6C.

Tabela 3-4: Amostras correspondentes aos indivíduos pertencentes à amostra aleatória que foram submetidas a sequenciação do fragmento do gene da cápsula.

Estirpe	Serótipo submetido a sequenciação	<i>Accession Number</i> da estirpe controlo [39]	Semelhança entre o produto de PCR e a sequência da estirpe de referência (%)
456G	10A	GenBank: CR931649.1 (gene <i>wcrG</i>)	100%
1192G	24	GenBank: CR931686.1 (gene <i>wzy</i>)	Inconclusivo
1313G	15A/F	GenBank: CR931663.1 (15A); GenBank: CR931666.1 (15F) (gene <i>wzy</i>)	100% (15A)
1314N	SG6	GenBank: JF911496.1 (6A) GenBank: CR931639.1 (6B) GenBank: JF911515.1 (6C) (gene <i>wzy</i>)	100% (6C)
1314G	SG6	GenBank: JF911496.1 (6A) GenBank: CR931639.1 (6B) GenBank: JF911515.1 (6C) (gene <i>wzy</i>)	100% (6C)
1314G	24	GenBank: CR931686.1 (gene <i>wzy</i>)	Inconclusivo
1908G	10A	GenBank: CR931649.1 (gene <i>wcrG</i>)	87%
2062G	22F/A	GenBank: CR931682.1 (22F); GenBank: CR931681.1 (22A) (gene <i>wcwI</i>)	94%
2097G	24	GenBank: CR931686.1 (gene <i>wzy</i>)	Inconclusivo
2800G	10A	GenBank: CR931649.1 (gene <i>wcrG</i>)	96%

Por último, o gráfico 3-4 sumariza o *ranking* dos serótipos obtidos, no total das 20 amostras consideradas positivas para a presença de *S. pneumoniae* nos indivíduos pertencentes à amostra aleatória.

Das 20 amostras nas quais foi detetado *S. pneumoniae* pelo método de PCR em tempo real, em 10 amostras não foi possível obter qualquer serótipo por PCR convencional. Contudo, foram consideradas positivas para a presença de *S. pneumoniae* dado que houve amplificação dos genes pneumocócicos *lytA* e *piaA* e tinham a presença do gene *cpsA*.

Como se pode constatar, o serótipo mais prevalente na amostra aleatória foi o SG6 (20,0%). No caso das amostras 670N e 670G, apesar de não ter detetado o serótipo específico (apenas foi detetado que pertenciam ao SG6), assumindo que se tratava do mesmo serótipo que foi detetado no *PneumoEL*, então ambas as amostras seriam do serótipo 6A. Este serótipo está incluído na vacina PCV-13, mas não na PPV-23, ao passo que o serótipo 6C (detetado nas amostras 1314N e 1314G) não está contemplado em nenhuma das vacinas disponíveis.

Relativamente ao SG23 (10,0%), não foram detetados os serótipos específicos dentro deste grupo. Assumindo que se tratava do mesmo serótipo que o que foi detetado no *PneumoEL*, a amostra 1278N pertenceria ao serótipo 23B, ao passo que a amostra 2012N pertenceria ao serótipo 23A. Nenhum dos dois serótipos está incluído nas vacinas PCV-13 e PPV-23.

O serótipo 3 (5,0%) encontra-se contemplado em ambas as vacinas, PCV-13 e PPV-23. O serogrupo 9N/L (5,0%), igualmente assumindo que se tratava do mesmo serótipo que o que foi detetado no *PneumoEL*, tratar-se-ia do serótipo 9L, não contemplado em nenhuma vacina disponível à data. Por último, no que diz respeito ao serótipo 15A (5,0%), este não se encontra incluído em nenhuma das vacinas disponíveis. Já o serótipo 10A (5,0%) encontra-se contemplado apenas na vacina PPV-23.

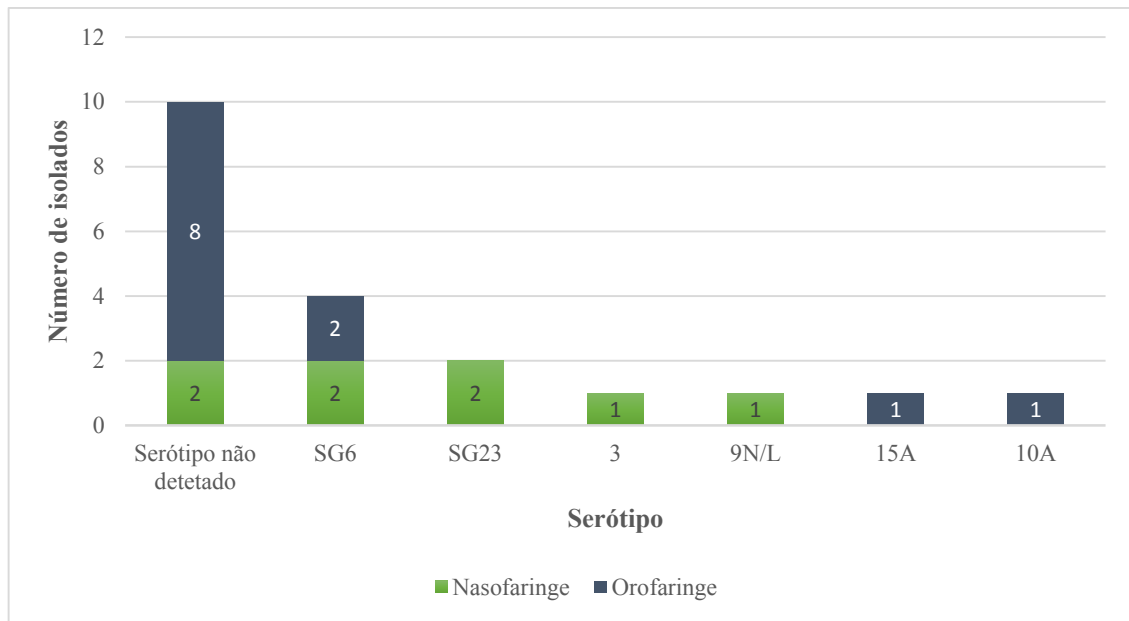


Gráfico 3-4: Diversidade de serótipos de *S. pneumoniae* detetados por PCR convencional (estratégia do CDC), das amostras referentes aos indivíduos pertencentes à amostra aleatória.

3.2.3. Prevalência de portadores de *S. pneumoniae*

Na tabela 3-5 encontram-se sumarizados os resultados referentes à detecção de portadores de *S. pneumoniae*, de acordo com a localização anatômica e o método de detecção utilizado.

Como se pode constatar, na faixa etária em estudo, adultos com mais de 60 anos de idade, a prevalência de colonização por *S. pneumoniae* foi mais elevada na orofaringe (16,7% no lar de idosos e 6,0% na amostra aleatória), face à nasofaringe (15,4% no lar de idosos e 4,0% na amostra aleatória).

Relativamente ao método de detecção, a colonização da orofaringe é menos detetada por cultura (3,8% no lar de idosos e 0% na amostra aleatória), ao passo que na nasofaringe a colonização é igualmente detetada por ambos os métodos (15,4% no lar de idosos e cerca de 4,0% na amostra aleatória).

Analisando os resultados ao nível do número de portadores, dos resultados referentes às amostras dos 78 indivíduos residentes no lar de idosos, no total 16 indivíduos (20,5%) eram portadores de *S. pneumoniae*. Destes, 3 não tinham sido detetados no *PneumoEL*, quando apenas foram utilizados métodos tradicionais de cultura, para detecção de pneumococos.

Dos resultados referentes às amostras dos 200 indivíduos pertencentes à amostra aleatória, no total 18 indivíduos (9,0%) eram portadores de *S. pneumoniae*. Destes, 11 não tinham sido detetados no *PneumoEL*, quando apenas foram utilizados métodos tradicionais de cultura, para deteção de pneumococos.

Por último, o gráfico 3-5 sumariza o *ranking* dos serótipos obtidos, no total dos 16 portadores de *S. pneumoniae* na coleção correspondente aos indivíduos residentes no lar de idosos. De notar que 2 indivíduos (1786 e 1799) estavam colonizados com 2 serótipos diferentes (um em cada nicho ecológico) (tabela 3-1).

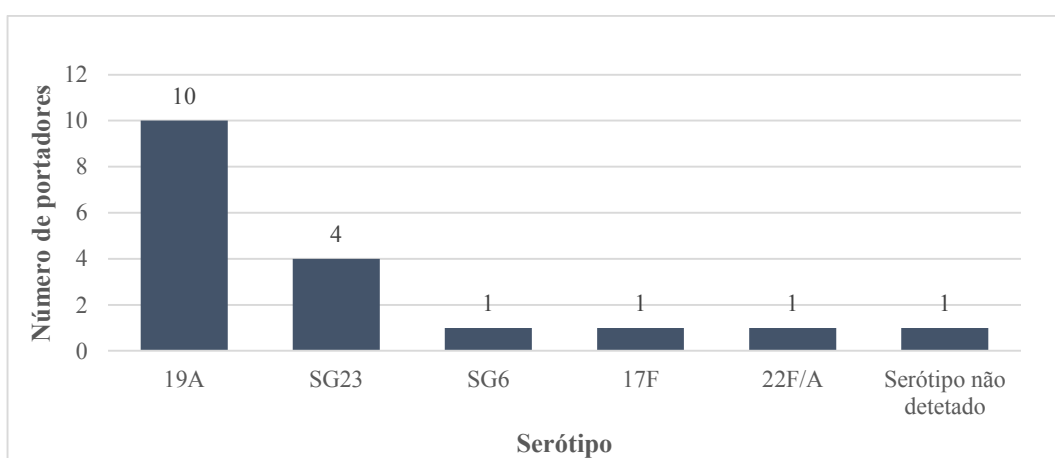


Gráfico 3-5: *Ranking* de serótipos detetados por PCR convencional (estratégia do CDC), do total de portadores de *S. pneumoniae*, referentes aos indivíduos residentes no lar de idosos.

O gráfico 3-6 sumariza o *ranking* dos serótipos obtidos, no total dos 18 portadores de *S. pneumoniae* na coleção correspondente aos indivíduos pertencentes à amostra aleatória.

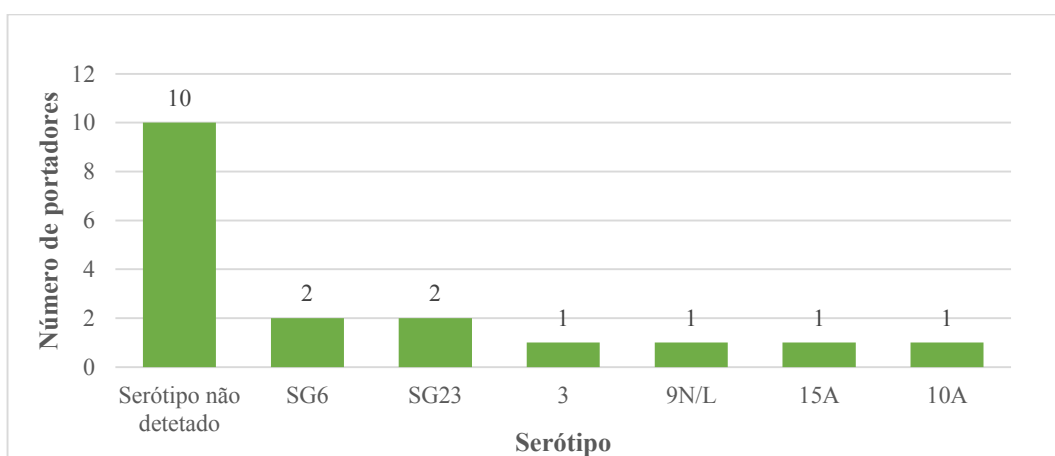


Gráfico 3-6: *Ranking* de serótipos detetados por PCR convencional (estratégia do CDC), do total de portadores de *S. pneumoniae*, referentes aos indivíduos pertencentes à amostra aleatória.

Tabela 3-5: Detecção de portadores de *S. pneumoniae* de acordo com a localização anatômica e método de detecção utilizado.
(CBT – crescimento bacteriano total; qPCR – PCR em tempo real; A.A. – Amostra aleatória)

Coleção	Nº indivíduos	Orofaringe				Nasofaringe				Número de Portadores		
		CBT	Cultura + (%)	qPCR + (%)	Pelo menos um dos métodos + (%)	CBT	Cultura + (%)	qPCR + (%)	Pelo menos um dos métodos + (%)	Cultura + (N e/ou O) (%)	qPCR + (N e/ou O) (%)	Total (%)
Lar	78	78	3 (3,8%)	13 (16,7%)	13 (16,7%)	24	12 (15,4%)	12 (15,4%)	12 (15,4%)	13 (16,7%)	16 (20,5%)	16 (20,5%)
A.A.	200	199	0 (0%)	12 (6,0%)	12 (6,0%)	48	7 (3,5%)	8 (4,0%)	8 (4,0%)	7 (3,5%)	18 (9,0%)	18 (9,0%)

4. Discussão e conclusões

4. Discussão e conclusões

Os métodos moleculares para detecção de *S. pneumoniae* surgiram com o compromisso associado de uma maior sensibilidade no âmbito da detecção desta bactéria [33,40,41]. São vários os estudos que demonstram uma prevalência superior de colonização por *S. pneumoniae* quando utilizados métodos moleculares, comparativamente ao método convencional de cultura [19,20]. Num estudo em que foi investigada a colonização por *S. pneumoniae* na saliva de 50 crianças em idade escolar, pelos métodos convencional e molecular, Wyllie *et al* detetaram apenas 4% de colonização pelo método convencional, e 88% por PCR em tempo real [20]. Estes resultados estão também em concordância com o estudo de Trzcinski *et al*, no qual também foram aplicados os métodos convencional e molecular para determinar a prevalência de *S. pneumoniae*, neste caso na nasofaringe e orofaringe de 268 adultos. Neste último estudo, por cultura foram detetados apenas 19% de portadores, ao passo que utilizando o método molecular de PCR em tempo real foram detetados 39% [19].

A necessidade de uma elevada sensibilidade na detecção de *S. pneumoniae* em portadores é particularmente pertinente em estudos realizados em indivíduos com mais de 60 anos de idade, nos quais a taxa de colonização por *S. pneumoniae* é muito baixa, na ordem dos 2 a 5 % quando utilizado o método convencional de cultura [16,21]. Neste sentido, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a prevalência de colonização da nasofaringe e orofaringe por *S. pneumoniae*, em adultos com idade superior a 60 anos, utilizando o método de diagnóstico de PCR em tempo real.

Os resultados obtidos mostraram que testar a colonização de *S. pneumoniae* apenas pelo método convencional de cultura subestima a sua prevalência neste grupo. Na mesma coleção de amostras, enquanto no projeto *PneumoEL* foi apenas detetada uma prevalência de colonização por *S. pneumoniae* de 2,3% (utilizando somente métodos de cultura), neste estudo, ao utilizar-se o método de detecção molecular, esta percentagem foi superior. Na coleção de amostras do lar de idosos, a prevalência de colonização por *S. pneumoniae* foi mais elevada, embora não sendo estatisticamente significativa: subiu de 16,7% para 20,5% ($p = 0,54$ com um intervalo de confiança de 95%). Analisando os dados da coleção da amostra aleatória, a prevalência de portadores aumentou significativamente: a

prevalência de colonização por *S. pneumoniae* subiu de 3,5% para 9,0% ($p = 0,02$ com um intervalo de confiança de 95%) (tabela 3-5).

O valor acrescido que se obtém ao usar-se o método de PCR em tempo real na detecção de *S. pneumoniae* na faixa etária em estudo toma particular importância principalmente ao nível da orofaringe. Nesta localização anatômica a percentagem de detecção por PCR em tempo real é bastante superior face à detetada com recurso ao método convencional de cultura (4,4 vezes superior na coleção de amostras do lar de idosos e de 0% para 6,0% na coleção da amostra aleatória). Relativamente às amostras da nasofaringe, os resultados deste estudo sugerem que não há grande vantagem em usar-se a PCR em tempo real na detecção de *S. pneumoniae* neste nicho ecológico, uma vez que a bactéria foi igualmente detetada por ambos os métodos (15,4% na coleção de amostras do lar de idosos e 3,5% - 4,0% na coleção da amostra aleatória).

Comparando as duas localizações anatômicas, os dados obtidos sugerem que em adultos com mais de 60 anos, a taxa de colonização por *S. pneumoniae* é mais elevada na orofaringe, do que na nasofaringe (na amostra aleatória esta prevalência foi de 6,0% e 4,0%, respetivamente). Estes resultados estão de acordo com os estudos de Trzcinski *et al* [19] e Krone *et al* [21] que ao compararem estas duas localizações anatômicas em populações adultas e idosas, respetivamente, também observaram uma maior prevalência de colonização da orofaringe face à nasofaringe (35% *versus* 19% na população adulta e 11% *versus* 5% na população idosa). No entanto, os resultados obtidos no nosso estudo sugerem que há vantagem em investigar a prevalência de colonização nas duas localizações anatômicas em simultâneo, pois com esta combinação obteve-se uma prevalência de portadores superior à obtida quando se investigou apenas a colonização da orofaringe (9,0% *versus* 6,0%, respetivamente).

Analisando os resultados obtidos ao nível do número de portadores de *S. pneumoniae* (tabela 3-5), em ambas as coleções, ao utilizar-se a PCR em tempo real foi observado um número de portadores superior, o que corrobora a incontestável vantagem do uso deste método na detecção de *S. pneumoniae*. De destacar os resultados da coleção correspondente à amostra aleatória, na qual o número de portadores foi cerca de 3 vezes superior ao previamente detetado usando somente o método tradicional de cultura na detecção.

Ao compararmos a prevalência de portadores da coleção obtida no lar de idosos com a coleção da amostra aleatória, constatou-se que na primeira a prevalência de colonização por *S. pneumoniae* era mais elevada (20,5% e 9,0%, respetivamente). Este facto deve-se provavelmente ao facto de se tratar de um local confinado onde a transmissão é favorecida [26].

Da análise dos resultados da deteção de *S. pneumoniae* por PCR em tempo real (gráficos 3-1 e 3-2), torna-se pertinente destacar que tendencialmente as amostras da nasofaringe têm valores de C_t inferiores aos das amostras da orofaringe. É também interessante verificar que foi precisamente nas amostras da nasofaringe que a bactéria *S. pneumoniae* foi mais facilmente detetada visualmente pelo método de cultura. A maioria das amostras da orofaringe foram dadas como negativas para a presença de *S. pneumoniae* no projeto *PneumoEL*, tendo sido este detetado apenas por PCR em tempo real. Esta observação está provavelmente relacionada com o facto das amostras da orofaringe serem mais polimicrobianas e onde a densidade de colonização por *S. pneumoniae* é menor, dificultando a sua deteção a olho nu em cultura.

Alguns autores sugerem que quando são utilizados apenas métodos moleculares para a deteção de *S. pneumoniae* na orofaringe, pode existir uma elevada taxa de falsos positivos [42]. Contudo, à luz do conhecimento atual a probabilidade disso acontecer é mais baixa, quando a presença de *S. pneumoniae* é investigada testando dois genes pneumocócicos que são conservados, *lytA* e *piaA* (em vez de apenas um), aumentando a especificidade do ensaio.

Apesar de o método convencional de cultura apresentar vantagens, nomeadamente baixo custo, elevada especificidade, possibilidade de realização do teste de suscetibilidade a antibióticos, entre outras, possui como limitação a sua sensibilidade [33]. Atualmente, os novos métodos de diagnóstico molecular, neste caso a PCR em tempo real, além da sensibilidade aumentada, têm como vantagens a rapidez na obtenção de resultados, a não exigência de bactérias viáveis para deteção de *S. pneumoniae*, bem como a obtenção de resultados a nível quantitativo [40,41]. Apresenta como principais desvantagens, o facto de ser uma técnica muito dispendiosa, que exige um equipamento específico e igualmente dispendioso, além de técnicos com *expertise*, quer ao nível da realização quer da interpretação dos resultados obtidos.

A cápsula polissacárida, ao ser o principal fator de virulência de *S. pneumoniae*, tem um valor epidemiológico elevado, permitindo por exemplo estimar potenciais coberturas vacinais numa dada população. Neste sentido, tornou-se pertinente avaliar os resultados a este nível. Relativamente ao tipo de cápsula das estirpes de *S. pneumoniae* que foram detetadas neste estudo, comparando com o *ranking* de serótipos obtidos no projeto *PneumoEL* [16], a distribuição aqui obtida foi diferente. O serótipo mais prevalente no *PneumoEL* foi o 19A, serótipo que não foi detetado na amostra aleatória do presente estudo (gráfico 3-4). Esta ausência de deteção do serótipo 19A deve-se provavelmente ao facto de na seleção da amostra aleatória terem sido excluídos os indivíduos pertencentes ao lar de idosos (que constituíram a outra coleção estudada), local onde se detetou uma elevada abundância deste serótipo (6 de 10 portadores), e que contribuiu em grande medida para o *ranking* de serótipos observado no estudo inicial do projeto *PneumoEL*.

Houve concordância relativamente ao segundo e terceiro serogrupos mais prevalentes neste estudo, o SG23 e o SG6, que foram também dos mais prevalentes no projeto *PneumoEL*.

Relativamente à cobertura vacinal teórica, esta foi relativamente baixa para ambas as vacinas disponíveis na amostra aleatória, PCV-13 (11,1%) e PPV-23 (11,1%), o que poderá ser explicado pelo uso massivo da vacina PCV-7 nas crianças, o que terá resultado num efeito de grupo, ao reduzir a circulação destes serótipos na população e consequentemente também a sua colonização em adultos [43]. A cobertura vacinal na coleção de amostras do lar de idosos foi bastante superior, 62,5% para a PCV-13 e 75,0% para a PPV-23. A ser necessário, o uso da vacina pneumocócica nesta população teria uma eficácia provavelmente elevada.

Ao nível da determinação do tipo de cápsula, este estudo teve limitações. Do total de amostras positivas para a presença de *S. pneumoniae* (amostra aleatória), em apenas 50% das amostras (10 das 20) se conseguiu atribuir um serótipo, incluindo duas amostras nas quais foi detetado um serótipo no *PneumoEL* e que neste estudo não foi possível atribuir-lhes um serótipo (390N e 2760N) (gráfico 3-4). Este facto prende-se provavelmente com a carga bacteriana destas amostras, na qual a quantidade de pneumococos era suficiente para ser detetável por PCR em tempo real, mas demasiado baixa para ser detetável por PCR convencional. Outra hipótese é as restantes amostras conterem serótipos que não

foram sequer testados, uma vez que o método utilizado apenas deteta 42 dos cerca de 95 serótipos existentes. Uma opção no sentido de ultrapassar esta limitação poderia ter passado por utilizar a técnica de *microarray* para detetar o maior número de serótipos possível.

De destacar ainda que neste estudo não foi detetada nenhuma estirpe de pneumococos não capsulada. Este resultado é diferente dos obtidos noutros estudos, nos quais foi detetada uma elevada prevalência de estirpes não capsuladas nas coleções analisadas (superior a 20,0%) [44].

Krone *et al* detetaram co-colonização em cerca de 20% dos indivíduos [21], dos quais metade tinha dois serótipos distintos no mesmo nicho ecológico e a outra metade tinha dois serótipos distintos em nichos ecológicos diferentes. No nosso estudo, apenas foram detetados dois casos de co-colonização (cerca de 3%), na coleção correspondente ao lar de idosos, em que foram detetados dois serótipos, um em cada localização anatómica. A baixa taxa de co-colonização detetada no nosso estudo deve-se provavelmente ao método de determinação do tipo de cápsula utilizado cujas limitações já foram discutidas. Krone *et al* utilizaram a PCR em tempo real na determinação do tipo de cápsula, que tal como já foi referenciado, é um método muito mais sensível que a PCR convencional utilizada no nosso estudo.

Outra limitação deste estudo foi ao nível da sequenciação do fragmento do gene da cápsula relativo ao serótipo 24, onde não foi possível obter-se um resultado conclusivo, dado o produto de PCR ser muito pequeno (apenas 99pb), não tendo sido possível um alinhamento da sequência obtida nas amostras com a sequência controlo. De futuro, no sentido de ultrapassar esta limitação, sugere-se o desenho de novos *primers* com um tamanho superior aos utilizados para este serótipo.

Por último, o facto de não ter sido efetuado o isolamento dos pneumococos poderá ter constituído uma limitação deste estudo, uma vez que consequentemente também não houve a possibilidade de caracterizar as estirpes detetadas (por exemplo, por antibiograma ou *MultiLocus Sequence Typing* - MLST).

Em conclusão, com este estudo observou-se que a técnica de diagnóstico molecular de PCR em tempo real é particularmente útil no estudo de portadores de *S. pneumoniae* em populações em que se estima que a prevalência de colonização seja baixa. Este método é mais sensível na deteção de *S. pneumoniae*, comparativamente ao método convencional de cultura, quando utilizados os genes pneumocócicos conservados *lytA* e *piaA*. O número de portadores – adultos com mais de 60 anos - aumentou significativamente utilizando este método de diagnóstico molecular, face aos valores anteriormente obtidos por métodos de cultura.

Quanto ao tipo de cápsula, não houve grande variação no *ranking* de serótipos detetados neste estudo, comparativamente aos serótipos detetados no *PneumoEL*. As principais variações serão provavelmente devido à dimensão da amostra que foi utilizada neste estudo face ao número de amostras do projeto *PneumoEL*.

Em termos de perspetivas futuras, seria interessante a utilização de uma metodologia de determinação do tipo de cápsula por PCR em tempo real, o que permitiria ultrapassar, entre outros aspetos, a questão da baixa carga bacteriana não detetável por PCR convencional. São já vários os autores que desenvolveram e publicaram várias versões desta metodologia [45-47]. Tendo em consideração que o *ranking* de serótipos em Portugal difere do *ranking* dos países onde já foi desenvolvida e aplicada esta metodologia, haverá provavelmente necessidade de otimização da técnica em questão, adaptada à realidade nacional.

Dado que são vários os estudos que sugerem resultados promissores na utilização da saliva em estudos de colonização [20], inclusive nos adultos [21], torna-se ainda pertinente e imperativo a realização de um estudo de colonização em adultos idosos que inclua também este produto biológico, além dos exsudados da nasofaringe e orofaringe.

À semelhança do projeto *PneumoEL*, este trabalho constitui um valioso contributo para o conhecimento científico relativo à colonização por *S. pneumoniae* na população idosa, faixa etária que até à data tem sido menos caracterizada na realização de estudos desta índole. Este trabalho estabelece também uma linha de investigação para futuros trabalhos neste âmbito, com pertinência acrescida face ao panorama nacional, no qual cerca de 20%

Reavaliação dos nichos ecológicos de *Streptococcus pneumoniae* em adultos com mais de 60 anos por PCR em tempo real

da população é idosa (dados dos Censos 2011), com tendência para que esta percentagem venha a aumentar no futuro.

5. Referências bibliográficas

5. Referências bibliográficas

1. **Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J** (1993) A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. Clin Infect Dis 17: 913-924.
2. **Winslow CE, Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede C, Rogers LA, Smith GH** (1920) The Families and Genera of the Bacteria: Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. J Bacteriol 5: 191-229.
3. **Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL** (2005) Harrison's - Principles of Internal Medicine. 16th ed., McGraw-Hill
4. **Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC** (1997) Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins
5. **Bogaert D, De Groot R, Hermans PW** (2004) *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. Lancet Infect Dis 4: 144-154.
6. **Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM** (2005) Medical Microbiology. Thieme, New York
7. **Pádua M** (2008) Patologia Clínica para Técnicos - Bacteriologia. Tomo I, Lusodidacta
8. **Sá-Leão R, Pinto F, Aguiar S, Nunes S, Carriço JA, Frazão N, Gonçalves-Sousa N, Melo-Cristino J, de Lencastre H, Ramirez M** (2011) Analysis of invasiveness of pneumococcal serotypes and clones circulating in Portugal before widespread use of conjugate vaccines reveals heterogeneous behavior of clones expressing the same serotype. J Clin Microbiol 49: 1369-1375.
9. **Parra EL, Ramos V, Sanabria O, Moreno J** (2014) Serotype and genotype distribution among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Colombia, 2005-2010. PLoS One 9: e84993.

10. **Abdullahi O, Karani A, Tigoi CC, Mugo D, Kungu S, Wanjiru E, Jomo J, Musyimi R, Lipsitch M, Scott JA** (2012) Rates of acquisition and clearance of pneumococcal serotypes in the nasopharynges of children in Kilifi District, Kenya. *J Infect Dis* 206: 1020-1029.
11. **Tigoi CC, Gatakaa H, Karani A, Mugo D, Kungu S, Wanjiru E, Jomo J, Musyimi R, Ojal J, Glass NE, Abdullahi O, Scott JA** (2012) Rates of acquisition of pneumococcal colonization and transmission probabilities, by serotype, among newborn infants in Kilifi District, Kenya. *Clin Infect Dis* 55: 180-188.
12. **Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt BG** (2003) Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis* 187: 1424-1432.
13. **Serrano I, Melo-Cristino J, Carriço JA, Ramirez M** (2005) Characterization of the genetic lineages responsible for pneumococcal invasive disease in Portugal. *J Clin Microbiol* 43: 1706-1715.
14. **Simões AS, Valente C, de Lencastre H, Sá-Leão R** (2011) Rapid identification of noncapsulated *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal samples allowing detection of co-colonization and reevaluation of prevalence. *Diagn Microbiol Infect Dis* 71: 208-216.
15. **Tuomanen EI, Mitchell TJ, Morrison D, Spratt BG** (2004) The pneumococcus. ASM Press
16. **Almeida ST, Nunes S, Santos Paulo AC, Valadares I, Martins S, Breia F, Brito-Avô A, Morais A, de Lencastre H, Sá-Leão R** (2014) Low prevalence of pneumococcal carriage and high serotype and genotype diversity among adults over 60 years of age living in Portugal. *PLoS One* 9: e90974.
17. **Chien YW, Vidal JE, Grijalva CG, Bozio C, Edwards KM, Williams JV, Griffin MR, Verastegui H, Hartinger SM, Gil AI, Lanata CF, Klugman KP** (2013) Density interactions among *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in the nasopharynx of young Peruvian children. *Pediatr Infect Dis J* 32: 72-77.

18. **Ogami M, Hotomi M, Togawa A, Yamanaka N** (2010) A comparison of conventional and molecular microbiology in detecting differences in pneumococcal colonization in healthy children and children with upper respiratory illness. *Eur J Pediatr* 169: 1221-1225.
19. **Trzcinski K, Bogaert D, Wyllie A, Chu ML, van der Ende A, Bruin JP, van den Dobbelsteen G, Veenhoven RH, Sanders EA** (2013) Superiority of trans-oral over trans-nasal sampling in detecting *Streptococcus pneumoniae* colonization in adults. *PLoS One* 8: e60520.
20. **Wyllie AL, Chu ML, Schellens MH, van Engelsdorp Gastelaars J, Jansen MD, van der Ende A, Bogaert D, Sanders EA, Trzcinski K** (2014) *Streptococcus pneumoniae* in saliva of Dutch primary school children. *PLoS One* 9: e102045.
21. **Krone CL, Wyllie AL, van Beek J, Rots NY, Oja AE, Chu ML, Bruin JP, Bogaert D, Sanders EA, Trzcinski K** (2015) Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in aged adults with influenza-like-illness. *PLoS One* 10: e0119875.
22. **Magomani V, Wolter N, Tempia S, du Plessis M, de Gouveia L, von Gottberg A** (2014) Challenges of using molecular serotyping for surveillance of pneumococcal disease. *J Clin Microbiol* 52: 3271-3276.
23. **Simell B, Auranen K, Kayhty H, Goldblatt D, Dagan R, O'Brien KL** (2012) The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev Vaccines* 11: 841-855.
24. **Snyder L, Champness W** (2007). *Molecular Genetics of Bacteria*. 3rd ed., ASM Press
25. **O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS, Cherian T** (2009) Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 374: 893-902.
26. **Walsh RL, Camilli A** (2011) *Streptococcus pneumoniae* is desiccation tolerant and infectious upon rehydration. *MBio* 2: e00092-00011.

27. **Sá-Leão R, Tomasz A, Sanches IS, Brito-Avô A, Vilhelmsson SE, Kristinsson KG, de Lencastre H** (2000) Carriage of internationally spread clones of *Streptococcus pneumoniae* with unusual drug resistance patterns in children attending day care centers in Lisbon, Portugal. *J Infect Dis* 182: 1153-1160.
28. **Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR** (2000) Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 30: 100-121.
29. **Atkinson W, Wolfe C, Hamborsky J** (2012) Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. p. 233-247, 12th ed., CDC
30. **Horácio AN, Lopes JP, Ramirez M, Melo-Cristino J** (2014) Non-invasive pneumococcal pneumonia in Portugal-serotype distribution and antimicrobial resistance. *PLoS One* 9: e103092.
31. **Saúde DGd** (2010) Circular Normativa nº. 12/DSPCD - Vacinação, a nível hospitalar, contra infeções por *Streptococcus pneumoniae* de crianças/adolescentes de risco para doença invasiva pneumocócica (DIP).
32. **Jackson LA, Neuzil KM, Yu O, Benson P, Barlow WE, Adams AL, Hanson CA, Mahoney LD, Shay DK, Thompson WW** (2003) Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine in older adults. *N Engl J Med* 348: 1747-1755.
33. **Blaschke AJ** (2011) Interpreting assays for the detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 52 Suppl 4: S331-337.
34. **Castillo D, Harcourt B, Hatcher C, Jackson M, Katz L, Mair R, Mayer L, Novak R, Rahalison L, Schmink S, Theodore MJ, Thomas J, Vuong J, Wang X, MCGEE L, Caugant DA, Chanteau S, Cognat S, Nicolas P** (2011) 10 - PCR for detection and characterization of bacterial meningitis pathogens: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae*, p. 105-156 in *Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae*. WHO Press, Geneva, Switzerland

35. **Mullis KB, Faloona FA** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
36. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1959) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press
37. **Satzke C, Turner P, Virolainen-Julkunen A, Adrian PV, António M, Hare KM, Henão-Restrepo AM, Leach AJ, Klugman KP, Porter BD, Sá-Leão R, Scott JA, Nohynek H, O'Brien KL** (2013) Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*: updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group. *Vaccine* 32: 165-179.
38. **Pai R, Gertz RE, Beall B** (2006) Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* 44: 124-131.
39. **Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabinowitsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail MA, Samuel G, Skovsted IC, Kalløft MS, Barrell B, Reeves PR, Parkhill J, Spratt BG** (2006) Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* 2: e31.
40. **Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Massai C, Becciolini L, de Martino M, Resti M** (2008) Molecular detection methods and serotyping performed directly on clinical samples improve diagnostic sensitivity and reveal increased incidence of invasive disease by *Streptococcus pneumoniae* in Italian children. *J Med Microbiol* 57: 1205-1212.
41. **Carvalho MdaG, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, Steigerwalt A, Whaley M, Facklam RR, Fields B, Carlone G, Ades EW, Dagan R, Sampson JS** (2007) Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol* 45: 2460-2466.
42. **Carvalho MdaG, Bigogo GM, Junghae M, Pimenta FC, Moura I, Roundtree A, Li Z, Conklin L, Feikin DR, Breiman RF, Whitney CG, Beall B** (2012) Potential nonpneumococcal confounding of PCR-based determination of serotype in carriage. *J Clin Microbiol* 50: 3146-3147.

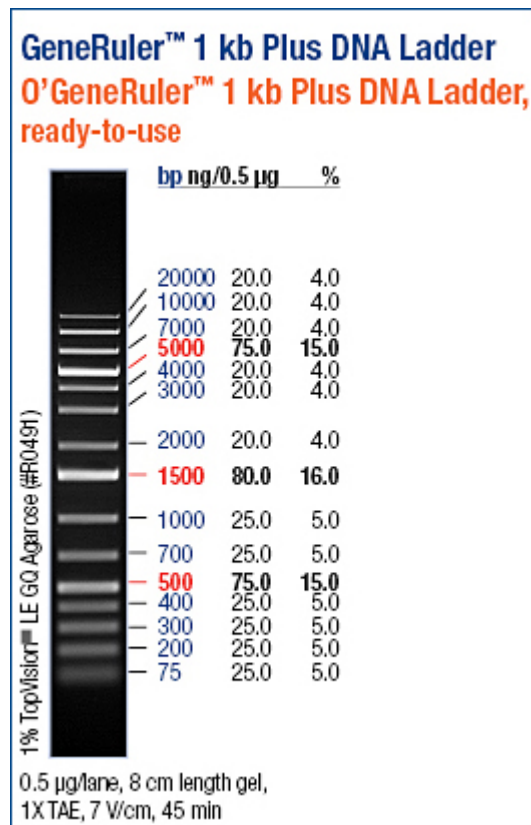
43. **Sá-Leão R, Nunes S, Brito-Avô A, Frazão N, Simões AS, Crisóstomo MI, Paulo AC, Saldanha J, Santos-Sanches I, de Lencastre H** (2009) Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect* 15: 1002-1007.
44. **Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, Porat N, Shainberg B, Pinco E, Keller N, Rubinstein E** (2004) Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family settings. *Clin Infect Dis* 38: 632-639.
45. **Pimenta FC, Roundtree A, Soysal A, Bakir M, du Plessis M, Wolter N, von Gottberg A, McGee L, Carvalho MdaG, Beall B** (2013) Sequential triplex real-time PCR assay for detecting 21 pneumococcal capsular serotypes that account for a high global disease burden. *J Clin Microbiol* 51: 647-652.
46. **Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Cortimiglia M, Canessa C, Becciolini L, Lippi F, de Martino M, Resti M** (2010) Realtime PCR is more sensitive than multiplex PCR for diagnosis and serotyping in children with culture negative pneumococcal invasive disease. *PLoS One* 5: e9282.
47. **Tarragó D, Fenoll A, Sánchez-Tatay D, Arroyo LA, Muñoz-Almagro C, Esteva C, Hausdorff WP, Casal J, Obando I** (2008) Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 14: 828-834.
48. **Brito DA, Ramirez M, de Lencastre H** (2003) Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 41: 2378-2384.
49. **Carvalho Mda G, Pimenta FC, Jackson D, Roundtree A, Ahmad Y, Millar EV, O'Brien KL, Whitney CG, Cohen AL, Beall BW** (2010) Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. *J Clin Microbiol* 48: 1611-1618.
50. **Dias CA, Teixeira LM, Carvalho Mda G, Beall B** (2007) Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J Med Microbiol* 56: 1185-1188.

51. **Lawrence ER, Griffiths DB, Martin SA, George RC, Hall LM** (2003) Evaluation of semiautomated multiplex PCR assay for determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and serogroups. J Clin Microbiol 41: 601-607.
52. **Hathaway LJ, Stutzmann Meier P, Battig P, Aebi S, Muhlemann K** (2004) A homologue of *aliB* is found in the capsule region of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol 186: 3721-3729.
53. **Messmer TO, Whitney CG, Fields BS** (1997) Use of polymerase chain reaction to identify pneumococcal infection associated with hemorrhage and shock in two previously healthy young children. Clin Chem 43: 930-935.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo I: Marcador de peso molecular – *GeneRuler™ 1kb Plus*



Anexo II: Preparação do meio de transporte de *Skim milk Tryptone-Glucose-Glycerol* (STGG) [37]

Ingredientes:

- Leite desnatado em pó: 2 g
- *Tryptone Soya Broth* (TSB): 3g
- Glucose: 0,5 g
- Glicerol: 10 ml
- Água destilada: até perfazer 100 ml

1. Agitar, a fim de dissolver todos os ingredientes.
2. Dispensar 1 ml em tubos *ependorf* de 1,5 ml.
3. Autoclavar durante 10 minutos a 121° C.
4. Manter os tubos refrigerados ou congelados a -20° C até à sua utilização.

Anexo III: Preparação de *primers* e sondas para PCR em tempo real

Deve seguir-se a seguinte recomendação:

- Re-hidratar os *primers*/sondas, adicionando o volume apropriado de Tris-EDTA (TE) 1 X estéril (concentração de 10 µM) de acordo com a seguinte equação:

$$V = X \text{ nmol} \times 10^3 \mu\text{l} / 10 \text{ nmol}$$

Anexo IV: *Primers* e sondas utilizadas na reação de PCR em tempo real para a detecção de *S. pneumoniae* (genes *lytA* & *piaA*)

Tabela IV-1: Sequências de *primers* e sondas utilizadas na reação de PCR em tempo real para a detecção de *S. pneumoniae* (genes *lytA* & *piaA*).

Gene	Nome do primer	Sequência	Ref.
<i>lytA</i>	<i>lytA_F</i>	5'-ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA	[41]
	<i>lytA_R</i>	5'-TCGTGCGTTTTAATTCCAGCT	
	<i>lytA_P</i>	5'-FAM-TGCCGAAAACGCXTTGATACAGGGAG-BHQ1	
<i>piaA</i>	<i>piaA_F</i>	5' -CATTGGTGGCTTAGTAAGTGCAA	[19]
	<i>piaA_R</i>	5' -TACTAACACAAGTTCCTGATAAGGCAAGT	
	<i>piaA_P</i>	5' -FAM-TGTAAGCGGAAAAGCAGGCCTTACCC-BHQ1	

Anexo V: *Primers* de PCR e *master mix* para a determinação da presença do gene *cpsA* por PCR convencional

Tabela V-1: *Primers* de PCR – gene *cpsA*.

Gene	Nome <i>primer</i>	Sequência <i>primer</i>	Tamanho produto PCR	Ref.
<i>cpsA</i>	<i>cpsA</i> -B_F	GCAGTACAGCAGTTTGTGACTGACC	160	[38]
	<i>cpsA</i> -B_R	GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC		

Tabela V-2: *Master mix* – gene *cpsA*.

Reagentes	[<i>Stock</i>]	[<i>Tubo</i>]	Volume <i>Tubo</i> (µl)
H ₂ O	---	---	4,35
Tampão <i>Go Taq</i>	5 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1
dNTPs	2 mM	0,12 mM	0,6
<i>Primer Mix cpsA</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Go Taq</i>	5 U/µl	0,025 U/µl	0,05
DNA	---	---	1

Anexo VI: Primers de PCR e master mix para os diferentes GR do procedimento de determinação do tipo de cápsula por PCR convencional (estratégia CDC) Adaptado de [38]

Tabela VI-1: Primers de PCR - GR 1.

Serótipo	Nome primer	Sequência primer	Tamanho produto PCR	Ref.
19F	19Fwzy_F	GTAAAGATTGCTGATCGATTAATTGATATCC	304 pb	[38]
	19Fwzy_R	GTAATATGTCTTTAGGGCGTTTATGGCGATAG		
3	3galU_F	ATGGTGTGATTCTCCTAGATTGGAAAGTAG	371 pb	[38]
	3galU_R	CTTCTCCAATTGCTTACCAAGTGCAATAACG		
SG6	6Bwzy_F	CGACGTAACAACAAAGAAGTAGGTGCTGAAAC	220 pb	[48]
	6Bwzy_R	AAGTATATAACCACGCTGTAAACTCTGAC		
16S rDNA	16S rDNA_F	ACATGCTCCACCGCTTGTG	522 pb	[14]
	16S rDNA_R	GCTCTGTTGTAAGAGAAGAACG		

Tabela VI-2: Master mix - GR 1.

Reagentes	[Stock]	[Tubo]	Volume Tubo (µl)
H ₂ O	---	---	1,35
Tampão <i>Go Taq</i>	5 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1
dNTPs	2 mM	0,12 mM	0,6
Primer Mix 19F	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
Primer Mix 3	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
Primer Mix SG6	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
Primer Mix 16S rDNA	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Go Taq</i>	5 U/µl	0,025 U/µl	0,05
DNA	---	---	1

Tabela VI-3: Primers de PCR - GR 2.

Serótipo	Nome <i>primer</i>	Sequência <i>primer</i>	Tamanho produto PCR	Ref.
21	21wzx_F	CTATGGTTATTTCAACTCAATCGTCACC	192 pb	[49]
	21wzx_R	GGCAAACCTCAGACATAGTATAGCATAG		
14	14cpsH-F	GTCTGTTTATTCTATATACAAAGAGGCTCC	268 pb	[48]
	14cpsH-R	GCATTGCTACAATCGCTATACTAGATATGC		
15A/F	15Awzy_F	ATTAGTACAGCTGCTGGAATATCTCTTC	436 pb	[38]
	15Awzy_R	GATCTAGTGAACGTACTATTCCAAAC		
33F/ 33A/37	33Fwzy_F	GAAGGCAATCAATGTGATTGTGTCGCG	338 pb	[38]
	33Fwzy_R	CTTCAAAATGAAGATTATAGTACCCTTCTAC		
16S rDNA	16S rDNA_F	ACATGCTCCACCGCTTGTG	522 pb	[14]
	16S rDNA_R	GCTCTGTTGTAAGAGAAGAACG		

Tabela VI-4: Master mix - GR 2.

Reagentes	[<i>Stock</i>]	[<i>Tubo</i>]	Volume <i>Tubo</i> (µl)
H ₂ O	---	---	0,35
Tampão <i>Go Taq</i>	5 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1
dNTPs	2 mM	0,12 mM	0,6
<i>Primer Mix 21</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 14</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 15A/F</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 33F</i>	10 pmol/ul	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 16S rDNA</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Go Taq</i>	5 U/µl	0,025 U/µl	0,05
DNA	---	---	1

Reavaliação dos nichos ecológicos de *Streptococcus pneumoniae* em adultos com mais de 60 anos por PCR em tempo real

Tabela VI-5: Primers de PCR - GR 3.

Serótipo	Nome primer	Sequência primer	Tamanho produto PCR	Ref.
19A	19AcpK_F	GTTAGTCCTGTTTTAGATTTATTTGGTGATGT	478 pb	[48]
	19AcpK_R	GAGCAGTCAATAAGATGAGACGATAGTTAG		
16F	16Fwzy_F	CTGTTTCAGATAGGCCATTTACAGCTTTAAATC	988 pb	[38]
	16Fwzy_R	CATTCCTTTTGTATATAGTGCTAGTTCATCC		
10A	10AwcrG_F	GGTGTAGATTTACCATTAGTGTCGGCAGAC	628 pb	[48]
	10AwcrG_R	GAATTTCTTCTTTAAGATTCCGATATTTCTC		
cpsA	cpsA_B_F	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC	160 pb	[38]
	cpsA_B_R	GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC		

Tabela VI-6: Master mix - GR 3.

Reagentes	[Stock]	[Tubo]	Volume Tubo (µl)
H ₂ O	---	---	0,85
Tampão <i>Go Taq</i>	5 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1
dNTPs	2 mM	0,12 mM	0,6
Primer Mix 19A	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
Primer Mix 16F	10 pmol/µl	1 pmol/µl	2
Primer Mix 10A	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
Primer Mix cpsA	10 pmol/µl	1 pmol/µl	0,5
<i>Go Taq</i>	5 U/µl	0,025 U/µl	0,05
DNA	---	---	1

Tabela VI-7: Primers de PCR - GR 4.

Serótipo	Nome <i>primer</i>	Sequência <i>primer</i>	Tamanho produto PCR	Ref.
22A/F	22FwcwV_F	GAGTATAGCCAGATTATGGCAGTTTTATTGTC	643 pb	[49]
	22FwcwV_R	CTCCAGCACTTGCCTGGAAACAACAGACAAC		
24	24wzy_F	GCTCCCTGCTATTGTAATCTTTAAAGAG	99 pb	[49]
	24wzy_R	GTGTCTTTTATTGACTTTATCATAGGTCGG		
34	34wzy_F	GCTTTTGTAAGAGGAGATTATTTTCACCCAAC	408 pb	[38]
	34wzy_R	CAATCCGACTAAGTCTTCAGTAAAAAACTTTAC		
35F	35Fwzy_F	GAACATAGTCGCTATTGTATTTTATTTAAAGCAA	517 pb	[38]
	35Fwzy_R	GACTAGGAGCATTATTCCTAGAGCGAGTAAACC		
<i>cpsA</i>	<i>cpsA</i> _B_F	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC	160 pb	[38]
	<i>cpsA</i> _B_R	GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC		

Tabela VI-8: Master mix – GR 4.

Reagentes	[<i>Stock</i>]	[<i>Tubo</i>]	Volume <i>Tubo</i> (µl)
H ₂ O	---	---	0,35
Tampão <i>Go Taq</i>	5 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1
dNTPs	2 mM	0,12 mM	0,6
<i>Primer Mix 22A/F</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 24</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 34</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 35F</i>	10 pmol/ul	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix cpsA</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Go Taq</i>	5 U/µl	0,025 U/µl	0,05
DNA	---	---	1

Tabela VI-9: Primers de PCR - GR 5.

Serótipo	Nome <i>primer</i>	Sequência <i>primer</i>	Tamanho produto PCR	Ref.
11A/D	11Awzy_F	GGACATGTTTCAGGTGATTTCCCAATATAGTG	463 pb	[49]
	11Awzy_R	GATTATGAGTGTAATTTATTCCAACCTTCTCCC		
1	1wzy_F	GGAGACTACTAAATTGTAATACTAACACAGCG	99 pb	[48]
	1wzy_R	CAAGGATGAATAAAGTAAACATATAATCTC		
17F	17FwciP_F	TTCGTGATGATAATTCCAATGATCAAACAAGAG	693 pb	[49]
	17FwciP_R	GATGTAACAAATTTGTAGCGACTAAGGTCTGC		
SG18	SG18wzy_F	CTTAATAGCTCTCATTATTCTTTTTTTAAGCC	573 pb	[49]
	SG18wzy_R	TTATCTGTAAACCATATCAGCATCTGAAAC		
<i>cpsA</i>	<i>cpsA</i> _B_F	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC	160 pb	[38]
	<i>cpsA</i> _B_R	GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC		

Tabela VI-10: Master mix – GR 5.

Reagentes	[<i>Stock</i>]	[<i>Tubo</i>]	Volume <i>Tubo</i> (µl)
H ₂ O	---	---	0,85
Tampão <i>Go Taq</i>	5 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1
dNTPs	2 mM	0,12 mM	0,6
<i>Primer Mix 11A/D</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 1</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 17F</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 18</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix cpsA</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	0,5
<i>Go Taq</i>	5 U/µl	0,025 U/µl	0,05
DNA	---	---	1

Tabela VI-11: Primers de PCR - GR 6.

Serótipo	Nome <i>primer</i>	Sequência <i>primer</i>	Tamanho produto PCR	Ref.
31	31wzy_F	GGAAGTTTTCAAGGATATGATAGTGGTGGTGC	701 pb	[38]
	31wzy_R	CCGAATAATATATTCAATATATTCCTACTC		
9N/L	9N/Lwzx_F	GAACTGAATAAGTCAGATTTAATCAGC	516 pb	[50]
	9N/Lwzx_R	ACCAAGATCTGACGGGCTAATCAAT		
7F/A	7Fwzy_R	CCTACGGGAGGATATAAAATTATTTTTGAG	826 pb	[38]
	7Fwzy_R	CAAATACACCACTATAGGCTGTTGAGACTAAC		
5	5wzy_F	ATACCTACACAACCTTCTGATTATGCCTTTGTG	362 pb	[38]
	5wzy_R	GCTCGATAAACATAATCAATATTTGAAAAAGTATG		
<i>cpsA</i>	<i>cpsA</i> _B_F	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC	160 pb	[38]
	<i>cpsA</i> _B_R	GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC		

Tabela VI-12: Master mix – GR 6.

Reagentes	[<i>Stock</i>]	[<i>Tubo</i>]	Volume <i>Tubo</i> (µl)
H ₂ O	---	---	0,35
Tampão <i>Go Taq</i>	5 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1
dNTPs	2 mM	0,12 mM	0,6
<i>Primer Mix 31</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 9N/L</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 7F/A</i>	10 pmol/ul	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 5</i>	10 pmol/ul	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix cpsA</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Go Taq</i>	5 U/µl	0,025 U/µl	0,05
DNA	---	---	1

Tabela VI-13: Primers de PCR – SG23.

Serótipo	Nome primer	Sequência primer	Tamanho produto PCR	Ref.
SG23	<i>cps23fH-F</i>	GATGCAAGAAATGTCGGTA	126 pb	[51]
	<i>cps23fH-R</i>	TCTGCCTCATTGTTCTCC		
16S rDNA	<i>16S rDNA_F</i>	ACATGCTCCACCGCTTGTG	522 pb	[14]
	<i>16S rDNA_R</i>	GCTCTGTTGTAAGAGAAGAACG		

Tabela VI-14: Master mix – SG23.

Reagentes	[Stock]	[Tubo]	Volume Tubo (µl)
H ₂ O	---	---	3,35
Tampão <i>Go Taq</i>	5 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1
dNTPs	2 mM	0,12 mM	0,6
<i>Primer Mix SG23</i>	10 pmol/ul	1 pmol/µl	1
<i>Primer Mix 16S rDNA</i>	10 pmol/µl	1 pmol/µl	1
<i>Go Taq</i>	5 U/µl	0,025 U/µl	0,05
DNA	---	---	1

Tabela VI-15: Primers de PCR – 15B/C (uniplex).

Serótipo	Nome <i>primer</i>	Sequência <i>primer</i>	Tamanho produto PCR	Ref.
15B/C	15B/Cwzy_F	TTGGAATTTTTTAATTAGTGGCTTACCTA	496	[38]
	15B/Cwzy_R	CATCCGCTTATTAATTGAAGTAATCTGAACC		

Tabela VI-16: Master mix 15B/C (uniplex).

Reagentes	[<i>Stock</i>]	[<i>Tubo</i>]	Volume <i>Tubo</i> (µl)
H ₂ O	---	---	4,85
Tampão <i>Go Taq</i>	5 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1
dNTPs	2 mM	0,12 mM	0,6
<i>Primer Mix 15B/C</i>	10 pmol/µl	0,5 pmol/µl	0,5
<i>Go Taq</i>	5 U/µl	0,025 U/µl	0,05
DNA	---	---	1

Anexo VII: *Primers* utilizados na reação de PCR convencional para detecção de NTPn

Tabela VII-1: Sequência dos *primers* utilizados na reação de PCR convencional para detecção de NTPn.

Gene	Nome do <i>primer</i>	Sequência	Tamanho produto PCR	Ref.
<i>aliB-like ORF2</i>	104_F13.6	AGATGCCAAATGGTTCACGG	290 pb	[52]
	104_b832.10	GAAACTCTTCGTTTACTGGG		
<i>lytA</i>	<i>lytA</i> 1145	AATCAAGCCATCTGGCTCTA	395 pb	[53]
	<i>lytA</i> 750	GGCTACTGGTACGTACATTC		
<i>16S rDNA</i>	<i>16S rDNA</i> F2	ACATGCTCCACCGCTTGTG	522 pb	[14]
	<i>16S rDNA</i> R2	GCTCTGTTGTAAGAGAAGAACG		
<i>cpsA</i>	<i>cpsA</i> F2	AGCAGTTTGTGTTGGACTGACC	613 pb	[14]
	<i>cpsA</i> R2	GTGTGAATGGACGAATCAAC		

Anexo VIII: como preparar as soluções de trabalho referentes ao protocolo de purificação pelo método Exo-SAP

Tabela VIII-1: Preparação das soluções de trabalho necessárias ao protocolo de purificação pelo método Exo-SAP.

Reagente	Reagente <i>Stock</i>	Solução de trabalho
Exonuclease I	<i>New England Biolabs</i> , número de ordem: M0293S; 3000 unidades com 20U/μl .	Exonuclease I (1 U/μl): Preparar pequenas alíquotas da solução <i>stock</i> diluída (1:20). <u>Alíquota de 100μl:</u> <ul style="list-style-type: none"> • 5μl Exonuclease I (Solução <i>stock</i>) • + 85μl tampão TE pH 7,5 • + 10μl glicerol
SAP	<i>USB Amersham</i> , número de ordem: E70092X; 5000 unidades com 1U/μl .	SAP (1 U/μl): Dividir a solução <i>stock</i> em pequenas alíquotas.

Anexo IX: Detecção de *S. pneumoniae* por PCR em tempo real (*lytA* & *piaA*) versus detecção de *S. pneumoniae* pelo método convencional de cultura em meio sólido (no âmbito do projeto *PneumoEL*)

Tabela IX-1: Detecção de *S. pneumoniae* no crescimento bacteriano total de exsudado nasofaríngeo e orofaríngeo, das amostras pertencentes aos indivíduos residentes no lar de idosos.

Amostra	C_t (<i>lytA</i>)	C_t (<i>piaA</i>)	Cultura
1736N	17,77	16,77	Positivo
1741G	24,20	23,83	Negativo
1742N	19,71	20,05	Positivo
1768G	31,34	31,34	Negativo
1770N	16,64	16,27	Positivo
1770G	19,65	19,22	Negativo
1777N	17,90	16,96	Positivo
1778G	23,66	21,86	Negativo
1785N	18,33	17,00	Positivo
1785G	24,57	23,18	Negativo
1786N	17,39	16,54	Positivo
1786G	23,51	22,44	Negativo
1788N	17,47	16,66	Positivo
1788G	26,06	21,01	Positivo
1790N	17,80	15,97	Positivo
1790G	20,24	18,65	Positivo
1791N	16,98	15,60	Positivo
1791G	35,84	30,46	Negativo
1793G	18,00	16,12	Positivo
1794N	20,18	19,20	Positivo
1794G	33,03	31,28	Negativo
1799N	17,32	16,66	Positivo
1799G	25,79	25,63	Negativo
1804N	18,41	17,43	Positivo
1804G	23,94	23,30	Negativo

Tabela IX-2: Detecção de *S. pneumoniae* no crescimento bacteriano total de exsudado nasofaríngeo e orofaríngeo, das amostras pertencentes aos indivíduos da amostra aleatória.

Amostra	C_t (<i>lytA</i>)	C_t (<i>piaA</i>)	Cultura
236N	17,14	17,68	Positivo
390N	20,81	20,25	Positivo
421N	22,80	22,03	Positivo
456G	27,94	29,35	Negativo
670N	18,48	17,35	Positivo
670G	26,11	25,92	Negativo
786G	24,92	27,49	Negativo
982G	26,39	26,36	Negativo
1192G	26,78	26,17	Negativo
1278N	21,29	20,00	Positivo
1313G	24,84	25,19	Negativo
1314N	28,38	28,69	Negativo
1314G	23,26	23,12	Negativo
1892G	34,17	34,22	Negativo
1908G	34,58	30,94	Negativo
2012N	19,45	19,54	Positivo
2062G	22,78	22,58	Negativo
2097G	30,44	29,83	Negativo
2760N	29,54	29,85	Positivo
2800G	31,53	31,53	Negativo
3171G	34,68	35,31	Negativo